1

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1913 — THÈSE — N° .....

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

RECHERCHES SUR QUELQUES CARACTÈRES DU PROTEUS VULGARIS

NOUVELLES DONNÉES EXPÉRIMENTALES sur le rôle des associations microbiennes en pathologie intestinale

PAR

M. Albert Charles Marie BERTHELOT

LICENCIÉ ÈS SCIENCES, ASSISTANT A L'INSTITUT PASTEUR
ANCIEN PRÉPARATEUR DE CHIMIE A L'ÉCOLE POLYTECHNIQUE
ANCIEN EXTERNE DES HÔPITAUX

Né à Paris, le 4 Février 1881

Travail du Laboratoire de M. METCHNIKOFF, à l'Institut Pasteur

Président : M. LANDOUZY, *professeur.*

Le candidat répondra aux diverses questions qui lui seront faites sur les diverses parties de l'enseignement médical

LAVAL
L. BARNÉOUD & Cie, IMPRIMEURS

1913

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Le Doyen : M. LANDOUZY.

Professeurs :

MM.	NICOLAS	Anatomie.
	Ch. RICHET	Physiologie.
	WEISS	Physique médicale.
	DESGREZ	Chimie organique et chimie générale.
	BLANCHARD	Parasitologie et histoire naturelle médicale.
	ACHARD	Pathologie et thérapeutique générales.
	WIDAL	Pathologie médicale.
	TEISSIER	
	LEJARS	Pathologie chirurgicale.
	P. MARIE	Anatomie pathologique.
	PRENANT	Histologie.
	N	Opérations et appareils.
	POUCHET	Pharmacologie et matière médicale.
	MARFAN	Thérapeutique.
	CHANTEMESSE	Hygiène.
	THOINOT	Médecine légale
	LETULLE	Histoire de la médecine et de la chirurgie.
	ROGER	Pathologie expérimentale et comparée.
	DEBOVE	Clinique médicale.
	LANDOUZY	
	GILBERT	
	CHAUFFARD	
	HUTINEL	Maladies des enfants.
	G. BALLET	Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.
	GAUCHER	Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.
	DEJERINE	Clinique des maladies du système nerveux.
	DELBET	Clinique chirurgicale.
	QUENU	
	RECLUS	
	HARTMANN	
	De LAPERSONNE	Clinique ophtalmologique.
	LEGUEU	Clinique des maladies des voies urinaires.
	BAR	Clinique d'accouchements.
	PINARD	
	RIBEMONT-DESSAIGNE	
	POZZI	Clinique gynécologique.
	KIRMISSON	Clinique chirurgicale infantile.
	A. ROBIN	Clinique thérapeutique.

Agrégés en exercice :

MM.	MM.	MM.	MM.
BALTHAZARD	DUVAL (Pierre)	LENORMANT	PROUST
BERNARD	GOUGEROT	LEQUEUX	RATHERY
BRANCA	GRÉGOIRE	LÉRI	RETTERER
BRINDEAU	GUENIOT	LOEPER	RICHAUD
BROCA (André)	GUILLAIN	MACAIGNE	ROUSSY
BRUMPT	JEANNIN	MAILLARD	ROUVIÈRE
CAMUS	JOUSSET (André)	MORESTIN	SCHWARTZ
CARNOT	LABBÉ (Marcel)	MULON	SICARD
CASTAIGNE	LANGLOIS	NICLOUX	TERRIEN
CHEVASSU	LAIGNEL LAVASTINE	NOBÉCOURT	TIFFENEAU
CLAUDE	LECÈNE	OKINCZYC	ZIMMERN
COUVELAIRE		OMBRÉDANNE	

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

Bien faible témoignage de mon affection
et de ma reconnaissance

A MON MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR LANDOUZY

Membre de l'Institut
Membre de l'Académie de médecine
Doyen de la Faculté de médecine de Paris

A MES MAITRES

MONSIEUR LE DOCTEUR ÉMILE ROUX

Membre de l'Institut
Membre de l'Académie de médecine
Directeur de l'Institut Pasteur

MONSIEUR LE PROFESSEUR METCHNIKOFF

Membre de l'Institut
Membre de l'Académie de médecine
Sous-directeur de l'Institut Pasteur

MONSIEUR GEORGES LEMOINE

Membre de l'Institut
Professeur honoraire à l'Ecole Polytechnique

A LA MÉMOIRE DE MON PREMIER MAITRE

MONSIEUR AIMÉ GIRARD

Membre de l'Institut
Professeur au Conservatoire National des Arts et Métiers

Hommage respectueux et reconnaissant

A LA MÉMOIRE DU GÉNÉRAL MAGNAN

A LA MÉMOIRE DU DOCTEUR E. ROUGIER

Ancien Médecin de la Marine

A MON MAITRE

MONSIEUR LE DOCTEUR LOUIS FOURNIER

Médecin de l'Hôpital Cochin

A MONSIEUR LOUIS-ALFRED HALLOPEAU

Docteur ès sciences

En témoignage de mon affectueuse
et profonde gratitude

A MES MAITRES

M. le Professeur LETULLE, de l'Académie de Médecine

M. le Professeur Agrégé A. BRINDEAU

Hommage reconnaissant pour toute la bienveillance
qu'ils m'ont témoignée

A MES MAITRES DANS LES HOPITAUX

M. Le Professeur BAR

M. Le Professeur LANDOUZY (externat)

M. Le Professeur LETULLE (externat)

M. Le Professeur QUÉNU

M. Le Professeur Agrégé BRINDEAU

M. Le Professeur Agrégé PIERRE DUVAL

M. Le Docteur LOUIS FOURNIER, Médecin de l'Hôpital Cochin (externat)

M. Le Professeur Agrégé GUÉNIOT

M. Le Professeur Agrégé LEQUEUX

A M. LÉON LINDET, Docteur ès sciences, Professeur à l'Institut National Agronomique.

A M. Le Docteur MAURICE NICOLLE, Professeur à l'Institut Pasteur.

A M. DANYSZ, Chef du service de Microbie agricole à l'Institut Pasteur.

A M. l'Abbé J. MAUMUS, Docteur ès sciences et en médecine, Aumônier de l'Hôpital de l'Institut Pasteur.

A MM. les Docteurs L. BELLIN, D. BERTRAND, COLLINET, A. COYON, DAUNAY, M. DELION, DEVRAIGNE, POZERSKI, SÉZARY, TIFFENEAU et JEAN TROISIER.

INTRODUCTION

Les recherches que je vais exposer portent toutes sur le *Proteus vulgaris*, mais elles forment cependant deux groupes bien distincts. Les unes, en effet, ont eu simplement pour objet de compléter quelques-unes des connaissances biologiques et biochimiques que nous possédons déjà sur ce microbe, tandis que les autres avaient surtout pour but d'apporter quelques données nouvelles sur le rôle des associations microbiennes en pathologie intestinale.

Les premières concernent elles-mêmes deux questions bien différentes, car je les ai entreprises non seulement pour préciser la valeur réelle de quelques caractères distinctifs du *Proteus*, mais aussi pour déterminer l'importance relative des facteurs de son action pathogène.

Cette diversité des sujets que j'ai examinés m'a conduit à diviser mon travail en trois parties. La première est consacrée à l'étude critique d'un petit nombre de caractères différentiels du *Proteus* : coloration par la méthode de Gram, action sur les hydrates de carbone, production de phénol et d'indol. Dans la seconde j'ai exposé mes recherches sur les substances toxiques élaborées par un *Proteus* d'origine bien déterminée ; à cet ensemble j'ai rattaché la relation de quelques essais d'immunisation et de diverses expériences sur le rôle anti-infectieux de la choline. Enfin, dans la troisième partie j'ai passé en revue les recherches que j'ai effectuées avec l'association du *Proteus* et du *B. aminophilus intestinalis* et j'ai commenté les faits assez intéressants qu'elles m'ont permis d'observer.

Grâce à la bienveillance de M. Metchnikoff et à l'amabilité de quelques-uns de mes collègues j'ai pu disposer, pour mes recherches, de soixante-et-une races de *Proteus*, de provenances très

diverses ainsi que l'on peut s'en rendre compte par le tableau ci-dessous :

Nos	ECHANTILLONS ISOLÉS PAR :	PROVENANCE :
1 à 24 35 à 40 45 à 57	M. Metchnikoff.	Diarrhées infantiles (Paris).
41	M. Metchnikoff.	Matières d'une adulte atteinte de troubles intestinaux chroniques.
25 à 34	M. D. M. Bertrand.	Diarrhées infantiles (Londres).
43	M. Fosse.	Otite.
44	M. H. Tissier.	Viande en putréfaction.
58 et 59	M. M. Cohendy.	Vomiques.
60	M. D. M. Bertrand.	Otite.
61	M. D. M. Bertrand.	Ozène.
42	Identifié par M. Legroux.	Collection de l'Institut Pasteur. Origine inconnue. Cultivé depuis longtemps sur gélose ordinaire.

Malgré cette diversité d'origines toutes ces races présentaient à un degré variable (1) les propriétés suivantes : mobilité, liquéfaction de la gélatine, coagulation du lait suivie de la digestion du coagulum, production d'ammoniaque et d'hydrogène sulfuré ; toutes possédaient donc un ensemble de caractères qu'accuse toujours le microbe décrit par Hauser (2) sous le nom de *Proteus vulgaris* et étudié dans certains ouvrages récents sous celui de *Bacillus vulgaris*. Au point de vue des propriétés sur lesquelles l'entente des bactériologistes n'est pas encore faite (fonction indologène, action sur les sucres) ces races semblaient différer quelque peu entre elles, mais, ainsi qu'on le verra plus loin, j'ai pu établir qu'il s'agissait de

1. Certains échantillons récemment isolés manifestaient, à la température du laboratoire, un pouvoir protéolytique très faible, mais celui-ci ne tardait pas à s'accroître à la suite des passages en milieux usuels.

2. Gustav Hauser, *Ueber Fäulnissbakterien ; ein Beitrag zur Morphologie der Spaltpilze*, 1885. F. C. W. Vogel, Leipzig.

différences apparentes et qu'elles appartenaient bien toutes à une seule et même espèce.

Mes expériences sur le rôle des associations microbiennes se rattachent à mes études sur la flore intestinale, tandis que c'est d'après les conseils de mon maître M. Metchnikoff que j'ai entrepris les recherches exposées dans les deux premières parties de ce travail ; il m'a d'ailleurs grandement facilité les unes et les autres en me confiant de nombreux échantillons de *Proteus* qu'il avait lui-même isolés et déterminés. Je l'en remercie vivement et je suis heureux de lui exprimer ici ma respectueuse gratitude pour toute la bienveillance qu'il ne cesse de me témoigner depuis que j'ai l'honneur de travailler sous sa direction. Il m'est très agréable également de trouver l'occasion d'adresser à M. Roux l'expression de ma sincère et profonde reconnaissance ; je ne saurais oublier que je lui dois d'appartenir à l'Institut Pasteur et d'avoir pu poursuivre mes études médicales et scientifiques. Enfin je tiens à remercier mes collègues MM. D. M. Bertrand, M. Cohendy, Fosse, R. Legroux et H. Tissier pour toutes les cultures de *Proteus* qu'ils ont bien voulu mettre à ma disposition.

PREMIÈRE PARTIE

Etude critique de quelques caractères différentiels du « Proteus vulgaris » Hauser.

CHAPITRE PREMIER

LE PROTEUS ET LA MÉTHODE DE GRAM

Tous les bactériologistes ne sont pas d'accord sur la manière dont se comporte ce microbe quand on le traite par la méthode de Gram. Les uns, et ce sont les plus nombreux et les plus anciens, le considèrent comme prenant le Gram ; les autres affirment qu'il se décolore toujours après l'action de la solution iodo-iodurée.

Bien des auteurs ont dû être frappés de cette divergence d'opinions, mais cependant il en est peu qui aient tenté de faire cesser l'indécision qui persistait sur ce point important. C'est Léon Feltz (1) qui le premier, en 1900, aborda sérieusement ce sujet ; ses essais portèrent sur quatre *Proteus* d'origines diverses qu'il étudia très complètement à différents points de vue.

A l'égard des affinités colorantes, après avoir répété maintes fois ses expériences dans des conditions variées, il en arriva aux conclusions suivantes : « Le *Proteus vulgaris* prend toujours le Gram, mais il faut pour cela opérer sur des cultures jeunes, ense-

1. Léon Feltz, *Le Proteus vulgaris* Hauser ; thèse de Pharmacie, Paris, 1900.

mencées sur des milieux où il pousse bien ; ces conditions sont très importantes pour arriver à de bons résultats. » Il fit également remarquer qu'il est indispensable de toujours employer une solution de violet de gentiane faite, au moment du besoin, avec de l'eau anilinée récente et que, si l'on veut utiliser le violet phéniqué il est de même nécessaire qu'il soit fraîchement préparé.

Etant donné le soin que Feltz avait apporté à ses recherches il semble que ses résultats auraient dû résoudre définitivement la question qui nous occupe ; pourtant il n'en est rien et, parmi les nombreux auteurs qui ont étudié le *Proteus* après lui, bien peu ont confirmé ses conclusions si catégoriques.

Je ne passerai pas en revue tous les travaux qui, depuis 1900, ont eu ce microbe pour objet et je me contenterai d'en citer trois, relativement récents. Ils sont d'ailleurs particulièrement suggestifs parce qu'ils ont été publiés presque en même temps, qu'ils ont porté sur des races isolées dans des lieux fort éloignés les uns des autres et qu'ils classent tous les trois le *Proteus* parmi les espèces ne prenant pas le Gram.

Dans le premier de ces mémoires, en juillet 1911, C. A. Herter et C. Ten Broeck (1), de New-York, indiquèrent, en effet, que les deux *Proteus* qu'ils ont examinés se décoloraient après l'action de l'iode. Dans le second, paru trois mois plus tard, E. Glaser et J. Hacla (2), de Vienne, dirent avoir étudié 16 *Proteus* d'origines très diverses et qui étaient tous Gram-négatifs. Enfin, en novembre de la même année, Ch. Cantù (3) publia les résultats de recherches entreprises à l'Institut Pasteur sur plus de 180 *Proteus* isolés par lui, dans les conditions les plus variées, et qui tous se décoloraient après traitement par la solution iodée.

Si ces divers auteurs avaient précisé la technique de leurs essais de coloration, peut-être aurais-je trouvé l'explication du désaccord qui existe entre leurs affirmations et celles de Feltz ; mais comme aucun d'eux n'a donné les détails nécessaires, j'ai tenu à me faire une opinion personnelle en utilisant les 61 *Proteus* que j'avais à ma disposition. Pour chacun de ces échantillons

1. C. A. Herter et Carl Ten Broeck, « A biochemical study of *Proteus vulgaris* Hauser ». *Journal of biological Chemistry*, t. IX, juillet 1911, p. 491.

2. E. Glaser et Josef Hacla, « Beiträge zur Kenntnis der Proteusbakterien... ». *Zeitschr. f. Immunitätsforschung*, I Original, t. XI, 14. okt. 1911, pp. 310-355.

3. Ch. Cantu, « Le Bacillus proteus, sa distribution dans la nature ». *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXV, nov. 1911, p. 852.

d'origines si diverses, j'ai fait plusieurs séries d'essais en employant des cultures en eau peptonée ou sur gélose ordinaire. L'eau peptonée était une solution à 20 pour 1.000 de Peptone pancréatique Defresne ; la gélose était préparée avec un mélange à parties égales de bouillon de viande non peptoné et de peptone Martin.

Les préparations étaient faites avec des cultures ayant sept, vingt-quatre, ou quarante-huit heures de séjour à 37° et établies en six exemplaires pour chaque série. Après dessication spontanée, deux d'entre elles étaient fixées par la chaleur à la manière ordinaire ; deux autres étaient fixées par immersion dans une solution aqueuse saturée de sublimé, contenant 5 pour 1.000 d'acide acétique, lavées à l'alcool et séchées à 37° ; enfin les deux dernières étaient arrosées avec un mélange à parties égales d'alcool absolu et d'éther que je laissais s'évaporer sans faire intervenir la chaleur. Ces préparations diversement fixées étaient traitées, les unes suivant l'ancienne technique — violet de gentiane aniliné fraîchement préparé, solution iodo-iodurée à 1 pour 300 d'iode, alcool absolu — les autres par la méthode généralement employée aujourd'hui — violet de gentiane phéniqué, solution iodo-iodurée au 1/300, décoloration par le mélange de Nicolle : Alcool absolu 5 volumes, acétone, 1 volume. Toutes étaient alors immergées quelques instants dans la fuchsine de Ziehl diluée au 1/10 pour recolorer les éléments microbiens devenus incolores.

De plus, je n'ai jamais employé de liqueur iodo-iodurée vieille de plus de quinze jours et j'ai toujours pris soin de faire une décoloration aussi ménagée que possible. Chaque fois que j'ai utilisé l'alcool-acétone j'ai suivi scrupuleusement les indications données par MM. Nicolle et Remlinger dans leur *Précis de Technique Microbiologique*. Je me suis donc placé dans des conditions très variées, mais malgré cela, parmi les nombreuses races de *Proteus* que j'ai examinées, je n'en ai pas trouvé une seule qui ait pris le Gram.

Cependant je n'ai pas voulu me contenter de ce résultat et j'ai fait encore quelques essais en utilisant des milieux qui me semblaient capables d'influencer quelque peu les affinités colorantes des *Proteus* cultivés sur eux. J'ai été guidé dans leur choix par les travaux de M. Guerbet, Mayer et Schaeffer (1) d'après lesquels les

1. M. Guerbet, Mayer et Schaeffer, « Sur les réactions micro-chimiques des corps gras et la réaction de Gram », *C. R. de la Soc. de Biologie*, 1910, t. LXVIII, p. 353.

microbes gardant la couleur après traitement par l'iode devraient cette propriété à la présence dans leur protoplasma d'acides gras non saturés. Ces milieux étaient les suivants :

A : Lait ;

B : Eau 100, Peptone pancréatique, extrait de viande, oléate de soude aa 1 gr.

C : Eau 100, Peptone pancréatique, extrait de viande, oléate de soude aa 1 gr., glucose 2 gr.

Pour ces expériences spéciales je n'ai pas employé tous mes *Proteus* ; j'ai pris simplement le n° 15 (diarrhée infantile), le n° 44 (viande en putréfaction) et le n° 42 (collection de l'Institut Pasteur). J'ai fait des préparations avec des cultures ayant 24 et 48 heures de séjour à 37°, je les ai fixées par la chaleur, l'alcool-éther ou le sublimé acétique et je les ai traitées par l'ancienne technique.

Le tableau ci-dessous rend compte de ce que j'ai observé ; le signe + y indique une préparation qui présentait d'assez nombreux éléments colorés en violet ou à peine décolorés et très granuleux ; le signe ± une préparation dans laquelle presque tous les microbes étaient décolorés, mais où l'on trouvait encore quelques éléments légèrement granuleux ; enfin le signe — équivaut à la décoloration totale.

NATURE DES CULTURES	FIXATION PAR :		
	Chaleur	Alcool, Ether	Sublimé acétiq.
	Nos 15 42 44	Nos 15 42 44	Nos 15 42 44
Milieu A { 24 heures . . .	— — —	± ± ±	± ± ±
Milieu A { 48 heures . . .	— — —	— — —	— — —
Milieu B { 24 heures . . .	— — —	— — —	— — —
Milieu B { 48 heures . . .	— — —	— — —	— — —
Milieu C { 24 heures . . .	+ + +	+ + +	— — —
Milieu C { 48 heures . . .	— — —	— — —	— — —

Ces résultats étant acquis, j'ai fait une expérience analogue pour laquelle j'ai employé le violet phéniqué et l'alcool acétone ; ainsi traitées, toutes les préparations n'ont présenté que des éléments décolorés.

Dans certaines conditions le *Proteus* peut donc acquérir transitoirement la propriété de retenir quelque peu la matière colorante après l'action de l'iode, mais ce fait est sans grande importance en raison des circonstances exceptionnelles dans lesquelles il se produit. Il est bon de le noter cependant, car il prouve une fois de plus la réelle efficacité de l'alcool acétoné et montre bien qu'en adoptant exclusivement ce décolorant on se garantit contre les erreurs qui pourraient provenir des modifications que certains milieux apportent aux affinités colorantes des microbes.

Enfin, il est un dernier point qu'il m'a fallu élucider, c'est celui qui résulte de l'imprécision dans laquelle Feltz a laissé ses lecteurs quant à la nature du décolorant qu'il a utilisé. Il dit simplement qu'il a toujours fait le « Gram-Weigert » en colorant avec du violet de gentiane aniliné, mais il ne parle pas des opérations consécutives ; or, si l'on se rapporte aux ouvrages de technique, comme ceux de Besson (1) ou de Rudolf Abel (2), on voit que la méthode de Gram modifiée par Weigert comporte avec l'emploi du violet aniliné, une décoloration par l'huile d'aniline pure. Il me fallait donc rechercher si ce procédé appliqué intégralement ne me donnerait pas des résultats différents de ceux que j'ai utilisés.

C'est ce que j'ai fait pour quelques *Proteus* pris au hasard parmi mes soixante-une races. Je les ai utilisés en cultures de 18 heures et je les ai traités suivant Weigert, avec des réactifs fraîchement préparés ; malgré cela j'ai constaté qu'ils se comportaient tous de la même façon qu'avec l'alcool-absolu et l'alcool-acétone.

En résumé, il résulte de mes recherches que le *Proteus vulgaris* Hauser, ne prend jamais le Gram, lorsqu'il provient de cultures en milieux usuels et qu'il est traité par la méthode de Gram-Nicolle. La diversité des races que j'ai étudiées ainsi que la multiplicité de mes essais, me donnent, il me semble, le droit de conclure d'une façon aussi formelle.

1. A. Besson, *Technique microbiologique et sérothérapique*, 5e éd. Paris, 1911.

2. R. Abel. *Bakteriologisches Taschenbuch*, 10e édition. Würzburg, 1906, p. 46.

CHAPITRE II

ACTION DU PROTEUS SUR LES HYDRATES DE CARBONE

Bien que le mode d'action sur les sucres constitue un des meilleurs caractères différentiels des espèces microbiennes, de nombreux ouvrages classiques sont muets sur ce point en ce qui concerne le *Proteus vulgaris*. Cette omission est d'autant plus regrettable qu'il s'agit d'un microbe très répandu dans la nature, tantôt saprophyte, tantôt pathogène et pouvant peut-être donner lieu à des races très voisines, ne se distinguant que par quelques caractères biochimiques.

A vrai dire la négligence des auteurs de ces ouvrages est peut-être voulue et elle a sans doute pour raison l'incertitude dans laquelle nous laissent les travaux des bactériologistes qui ont étudié les propriétés saccharolytiques du *Proteus*.

En effet, parmi ceux-ci, les uns comme Leiborius (1), Gaillard (2), Théobald Smith (3), Herter et Ten Broeck (4), sont d'accord pour affirmer que ce microbe, quelle que soit son origine, attaque toujours le glucose et le saccharose, mais laisse intact le lactose, tandis que d'autres comme Cantù (5) ont une opinion un peu différente.

Pour ce dernier « les sucres sont attaqués par tous les *Proteus*.

1. Leiborius, in *die Mikroorganismen* de Flügge, 1896.

2. Gaillard, *Contribution à l'étude chimique du Groupe Proteus*, Thèse de Médecine. Paris, 1897.

3. Theobald Smith, « Modifications temporary and permanent of the physiological characters of bacteria in mixed cultures ». *Trans. Ass. of Amer. Phys.*, IX, 1894, pp. 567-599.

4. Herter et Ten Broeck, *loc. cit.*

5. Ch. Cantu, *loc. cit.*

Avec le lactose seulement, l'attaque n'est pas constante avec toutes les races et avec un même *Proteus* ».

« Les races isolées des viandes et, en général, des substances animales pourries, attaquent les sucres avec une violence qu'on ne retrouve pas dans les cultures de *Proteus* isolées des végétaux : cette différence est vraie des premières cultures; elle s'efface quand les *Proteus* ont été réensemencés plusieurs fois et s'éloignent pour ainsi dire des conditions naturelles. »

Il est assez difficile de se faire une idée de la valeur respective des conclusions de ces divers auteurs, car elles résultent de recherches faites dans des conditions par trop dissemblables. C'est ainsi que Gaillard et Herter ont étudié un très petit nombre de races, alors que Cantù a examiné cent quatre-vingt-un *Proteus* d'origines extrêmement variées. D'autre part, les auteurs que je viens de citer ne précisent guère, dans leurs mémoires, la composition des milieux qu'ils ont utilisés et ne donnent que fort peu de détails sur la technique qu'ils ont suivie.

Comme j'avais la chance de disposer d'un grand nombre de *Proteus*, j'ai tenu à étudier, à mon tour, l'action de ce microbe sur les hydrates de carbone, non seulement dans le but de préciser quelque peu la valeur d'un caractère important, mais aussi pour être en mesure de mieux comparer les échantillons isolés des diarrhées infantiles avec ceux qui provenaient d'autres origines.

Afin de pouvoir examiner toutes les races que je possédais j'ai dû m'en tenir, comme Cantù, à une méthode de recherches simple et d'application rapide ; je me suis efforcé toutefois d'éviter les causes d'erreurs dont il ne semble pas s'être inquiété. Il est regrettable que le nombre d'essais à entreprendre m'ait forcé d'utiliser des procédés purement qualitatifs ; mais fort heureusement l'infériorité des résultats que ceux-ci m'ont donnés est largement compensée, il me semble, par la grande diversité d'origine des *Proteus* que j'ai étudiés.

Comme milieu de culture j'ai utilisé la solution suivante :

Eau	1.000
Peptone pancréatique Defresne sèche, en paillettes . .	20

A l'aide de microbes dont je connaissais parfaitement les propriétés biochimiques je m'étais assuré au préalable que l'échantillon de peptone qui devait me servir pour toutes mes expériences ne renfermait pas de substances hydrocarbonées pouvant don-

ner lieu à la production d'acides. Pour neutraliser l'eau peptonée je l'additionnais d'un excès de carbonate de calcium pur précipité et je la portais à l'ébullition pendant quelques minutes ; je laissais le carbonate se déposer et je décantais sur un filtre. Le liquide filtré, neutre au tournesol et à peine coloré était alors réparti dans des tubes à essais, dans lequels on en versait uniformément 10 centimètres cubes, puis stérilisé vingt minutes à 120°.

D'autre part je préparais des solutions concentrées des diverses substances parfaitement pures, sur lesquelles je voulais faire agir le *Proteus*, solutions qui étaient stérilisées soit à 120°, soit à froid (lévulose) par filtration sur bougie Chamberland. Pour chaque expérience, j'ajoutais aseptiquement dans une série de tubes d'eau peptonée un volume de solution sucrée calculé de telle façon que le milieu de culture contint environ 3 0/0 de l'hydrate de carbone considéré ; je plaçais alors tous ces tubes à l'étuve à 37°. Vingt-quatre heures après je m'assurais qu'aucun d'eux n'avait cultivé et je pratiquais l'ensemencement avec une race de *Proteus* provenant d'une culture de 24 heures sur gélose ordinaire. Les milieux sucrés ainsi ensemencés étaient mis à 37° en même temps qu'un nombre égal de tubes d'eau peptonée ensemencés avec les mêmes *Proteus*.

Après un temps convenable de séjour à l'étuve, je versais dans tous les tubes le même volume d'une teinture de tournesol sensible et je notais la réaction présentée par les diverses cultures en eau peptonée et en milieu sucré.

Mes essais ont porté sur le glucose, le galactose, le lévulose, le maltose, le saccharose, le lactose et la mannite ; mais comme le *Proteus* est avant tout un fort producteur d'ammoniaque, je ne me suis pas contenté d'un seul essai et j'ai examiné successivement des cultures de deux, cinq, dix et quinze jours. Voici les résultats que j'ai obtenus :

Avec le glucose et le galactose toutes les cultures de cinq, dix et quinze jours étaient acides, tandis qu'elles étaient toutes alcalines avec le lactose et la mannite. Je dois dire cependant qu'un certain nombre de cultures de deux jours sur glucose ou galactose étaient neutres, mais le cinquième jour elles étaient toutes devenues acides. Avec le saccharose, au bout de deux jours certaines cultures accusaient une réaction acide, tandis que d'autres étaient neutres ou faiblement alcalines ; les cultures de cinq jours étaient presque toutes acides, mais quelques-unes étaient neutres ; enfin les

cultures de dix et quinze jours étaient toutes nettement acides.

Les cultures sur lévulose et maltose se comportaient, au début, à peu près comme celles sur saccharose ; les unes étaient acides, les autres neutres ou alcalines ; mais le nombre de ces dernières ne diminuait pas, même au bout de dix ou quinze jours.

De l'ensemble de ces constatations il faut donc retenir que toutes les races de *Proteus*, *quelle que soit leur origine* (1), acidifient au bout de *dix jours à 37°*, les milieux renfermant du glucose, du galactose ou du saccharose comme unique aliment hydrocarboné, mais laissent neutres ou alcalins ceux qui contiennent du lactose ou de la mannite.

D'autre part il est important de remarquer que la grande variabilité des pouvoirs alcaligène et acidogène impose de ne tenir compte que des changements de réaction constatés sur des cultures assez âgées. Pour certains *Proteus*, en effet, la production d'ammoniaque est extrêmement précoce et intense, alors que la formation d'acides aux dépens des hydrates de carbone est assez lente ; on comprend facilement que dans ces conditions une observation trop hâtive donnerait un résultat inexact.

Ainsi qu'on peut s'en rendre compte par les faits rapportés plus haut, il suffit, pour éliminer cette cause d'erreur, de n'examiner les cultures qu'au bout de dix jours.

Pour ce qui concerne le lévulose et le maltose, si l'on avait affaire à une autre espèce qu'au *Proteus*, on pourrait conclure à l'existence de deux sortes de races caractérisées par leur différence d'action sur ces deux sucres. Mais avec un microbe comme celui qui nous occupe il serait singulièrement imprudent d'adopter de telles conclusions ; l'exemple du saccharose est là pour montrer que, dans des essais de cette sorte, basés simplement sur l'observation de la réaction finale, il ne faut pas oublier que celle-ci résulte du balancement des deux actions principales qui se manifestent simultanément dans les cultures : 1° attaque de l'aliment azoté avec formation d'ammoniaque, 2° attaque éventuelle de l'aliment hydrocarboné avec formation d'acides.

Tous les *Proteus* donnent peut-être des acides aux dépens du

1. A ce propos je dois faire observer que, pour éviter autant que possible l'influence de toute variation individuelle, je n'ai utilisé pour mes essais que des *Proteus* isolés depuis au moins deux mois et ayant subi de nombreux passages sur les milieux usuels.

lévulose ou du maltose et il est possible que la diversité des résultats que j'ai obtenus à cet égard tienne simplement à des différences d'intensité du pouvoir alcaligène et de l'action saccharolytique des diverses races.

On pourra facilement m'objecter que je n'aurais pas dû laisser persister un tel doute sur un point aussi important. A cela je répondrai qu'il m'était pratiquement impossible d'examiner l'action de 61 *Proteus* sur sept substances avec des méthodes comportant des déterminations quantitatives ; d'ailleurs je me suis déjà expliqué sur ce point.

Les résultats que m'ont donnés mes essais avec le glucose, le galactose, le saccharose, le lactose et la mannite sont assez constants, il me semble, pour aider à l'identification du *Proteus vulgaris*, d'autant mieux qu'ils confirment pour le glucose, le saccharose et le lactose les constatations des auteurs qui ont étudié quelques races avec des méthodes plus précises. Toutefois, ces résultats ayant été obtenus à l'aide d'un procédé purement qualificatif, je les considère simplement comme des renseignements utiles et je leur refuse toute valeur intrinsèque permettant de les utiliser à la distinction éventuelle de plusieurs races dans l'espèce créée par Hauser. A ce point de vue, seuls des dosages pourront fournir les données nécessaires.

Aussi bien, n'est-ce pas avec la simple étude analytique de l'action du *Proteus* sur quelques hydrates de carbone que l'on pourra trancher une telle question ; les recherches entreprises dans ce but ne devront pas seulement porter sur de nombreuses substances hydrocarbonées, mais aussi sur des albuminoïdes et leurs dérivés, ainsi que sur beaucoup d'autres sources de carbone et d'azote organiques ou minérales. Elles devront également ne pas se borner à la mesure de l'intensité et de la vitesse d'action de *Proteus* d'origines multiples sur tous ces corps, mais aussi apprécier les variations de cette vitesse ou de cette intensité sous des influences diverses et déterminer la nature des produits formés ; enfin elles devront coïncider avec une étude biologique complète des races considérées.

CHAPITRE III

LE PROTEUS CONSIDÉRÉ COMME PRODUCTEUR DE PHÉNOL ET D'INDOL

A. — Recherche du phénol et du p. crésol

En 1890, Lewandowsky (1) publia que les cultures de *Proteus vulgaris* en bouillon de viande contiennent à la fois du phénol et de l'indol. La plupart des auteurs qui étudièrent ce microbe après lui s'inquiétèrent peu du premier de ces corps et s'intéressèrent surtout au second qu'ils considéraient comme beaucoup plus facile à déceler. Toutefois Tissier et Martelly (2), en 1902, puis Dobrowolsky (3), en 1908 examinèrent à nouveau le *Proteus* au point de vue de la production de phénol. Les deux premiers auteurs étudièrent un *Proteus vulgaris* isolé d'une putréfaction de viande et ils confirmèrent les résultats de Lewandowsky.

Dobrowolsky utilisa pour ses recherches deux races dont il ne précise pas l'origine et qu'il cultiva sur bouillon additionné de 20 pour 1.000 de peptone et d'un excès de carbonate de calcium. Il analysa ses cultures au bout de 48 heures et, dans le distillat qu'elles lui fournirent, il trouva seulement des traces de phénol. Des dosages exécutés avec des cultures de 10 jours lui indiquèrent la présence de moins d'un milligramme de phénol *par litre* pour l'un des échantillons, et de trois milligrammes pour l'autre. Il

1. Lewandowsky, « Ueber Indol-und Phenolbildung durch Bakterien », *Deutsch. Med. Wochenschrift*, 1890, n° 51, p. 1186.

2. H. Tissier et Martelly, « Recherches sur la putréfaction de la viande de boucherie », *Annales de l'Institut Pasteur*, 1902, p. 865.

3. Dobrowolsky, « Des microbes producteurs de phénol », *Annales de l'Institut Pasteur*, 1910, n° 7, p. 595.

résulte donc des travaux de cet auteur que la production de phénol par le *Proteus vulgaris* est pratiquement sans importance.

Plus récemment Herter et Ten Broeck (1) recherchèrent aussi le phénol dans les cultures de deux races de *Proteus vulgaris*, mais ils n'en trouvèrent point, pas plus dans celles en bouillon peptoné que dans d'autres sur bouillon additionné de 0,2 pour 1.000 de tyrosine.

Enfin, pour ma part, je viens d'obtenir des résultats qui concordent absolument avec ceux de ces deux derniers auteurs. Dans un premier essai sur bouillon de viande peptoné additionné de CO^3Ca, aucun de mes *Proteus* ne m'a donné de phénol ; mais je ne m'en suis pas tenu là, car j'ai voulu, comme Herter, me placer dans de meilleures conditions de culture.

Ne pouvant naturellement effectuer ces nouvelles recherches sur 61 échantillons, j'ai pris au hasard, parmi eux, cinq *Proteus* de diarrhées infantiles (Paris et Londres) et cinq autres d'origines diverses (putréfaction, otites, vomique, collection de l'Institut Pasteur). J'ai d'abord ensemencé chacun d'eux dans trois ballons contenant 500 cc. de la solution suivante convenablement neutralisée :

Eau	1.000
Peptone pancréatique	20

La peptone que j'ai employée préparée par digestion trypsique de la viande, renfermait une quantité notable de tyrosine libre. Les ballons ensemencés étaient placés à l'étuve à 37° et, pour chaque *Proteus*, l'un d'eux était examiné au bout de quatre jours, un autre au bout de huit jours, enfin, un troisième après quinze jours.

Je neutralisais le contenu toujours alcalin de chaque ballon avec de l'acide sulfurique à 66 Bé puis j'assurais une acidité suffisante en ajoutant encore deux centimètres cubes du même acide ; je distillais rapidement dans un courant de vapeur d'eau surchauffée et je recherchais le phénol dans le distillat à l'aide de l'eau de brome et du réactif de Millon. Dans ces conditions, aucune de mes cultures, même les plus anciennes, ne contenait de phénol.

Avec les mêmes *Proteus* j'ai fait alors une expérience analogue, mais portant seulement sur des cultures de huit et quinze jours obtenues avec le milieu suivant :

1. Herter et Ten Broeck, *loc. cit.*

Eau	1.000,00
PO^4K^2H	1,50
SO^4Mg	0,50
$CaCl^2$	0,02
Glycocolle	2,00
Alanine	2,00
Aspartate de sodium	1,00
Glutamate de sodium	0,50
Tyrosine (en excès)	1,00

Cette fois encore je n'ai pu déceler trace de phénol ou de crésol dans le distillat des cultures acidifiées.

En résumé, *dans les conditions variées où je me suis placé*, le *Proteus vulgaris* Hauser n'est pas un producteur de phénol.

B. — Etude de la fonction indologène

Ainsi que je le disais au début de ce chapitre, les bactériologistes qui ont étudié le *Proteus vulgaris* ont généralement négligé la recherche du phénol dans les cultures de ce microbe. Par contre, toute leur attention s'est portée sur l'indol et, depuis Lewandowsky, ils ont toujours considéré la faculté de produire cette substance comme l'un des plus importants caractères du microbe de Hauser. En 1900, Feltz (1) étudia même assez complètement ce point de la biochimie du *Proteus*. Il eut l'heureuse idée de tenir compte des indications de Grimbert (2) sur la variabilité de composition des peptones et il montra qu'une même race de *Proteus* peut produire de l'indol aux dépens de certaines de ces préparations et ne pas en donner avec d'autres. Ses recherches qui portèrent sur 4 échantillons furent donc faites dans de meilleures conditions que celles de ses devanciers ; elles aboutirent à cette conclusion que le *Proteus vulgaris* se comporte toujours en producteur d'indol lorsqu'on le cultive dans un milieu préparé avec une peptone convenablement choisie.

Deux ans plus tard Tissier et Martelly examinèrent un *Proteus*

1. Feltz, *loc. cit.*

2. L. Grimbert, « De l'unification des méthodes de culture en bactériologie », *Archives de Parasitologie*, t. I, n° 2, p. 191, 1898.

isolé de viande en putréfaction ; ils trouvèrent qu'il produisait de l'indol même dans les cultures sur bouillie de viande.

La constance du caractère biochimique qui nous occupe semblait assez bien établie lorsqu'en 1906, F. A. Steensma (1) remarqua que le distillat des cultures de certaines races de *Proteus* ne contenait pas d'indol, alors que les cultures mêmes prenaient une coloration rose par addition de nitrite de potassium et d'acide sulfurique.

On ne prêta guère attention à ces faits pourtant intéressants et cinq ans après Herter et Ten Broeck n'en tinrent aucun compte quand, après avoir examiné seulement deux races, ils publièrent que le *Proteus* cultivé dans une solution de peptone de Witte (1 0/0) et d'extrait de viande Liebig (0,4 0/0) produit un peu d'indol et une quantité notable d'acide indolacétique.

Dans un travail paru à peu près à la même époque que celui d'Herter, Cantù considère ce microbe comme un producteur d'indol et, bien qu'il en ait étudié plus de 180 échantillons, il ne dit pas en avoir trouvé qui n'ait pas ce caractère.

En 1912, Louis Gauthier (2), se basant sur l'examen de deux races, publia que les cultures de *Proteus* dans une solution de peptone pancréatique contiennent toujours de l'indol au bout de douze heures.

Enfin, quelques mois plus tard, J. J. van Loghem et J. C. W. van Loghem-Pouw (3), après avoir étudié 30 échantillons, confirmèrent les résultats obtenus par Steensma et crurent bien faire de considérer comme représentants d'une espèce à part, *Bacillus proteus anindologenes*, les *Proteus vulgaris* ne donnant pas d'indol.

En présence d'une telle confusion il m'a semblé utile de déterminer, d'une manière aussi précise que possible, quelle est la valeur réelle de la fonction indologène en tant que caractère spécifique du *Proteus vulgaris*. Pour cela, j'ai fait porter mes recherches sur les 61 *Proteus* dont je disposais.

Avant d'exposer le détail de mes expériences, je crois bon d'in-

1. Steensma, « Ueber den Nachweis von Indol ... in Bakterienkulturen » *Centralbl. f. Bakteriologie*, Original, mai 1906, t. XLI, p. 215.

2. Louis Gauthier, *Recherches sur l'indol en microbiologie*, thèse de pharmacie, Lyon, 1912.

3. J. J. Van Loghem et J. C. W. Van Loghem-Pouw, « Beitrag zur Differenzierung der Proteus-Gruppe », *Centralbl. f. Bakteriologie*, Original, t. LXVI, 24 août 1912.

sister quelque peu sur les procédés que j'ai employés pour déceler la présence de l'indol dans les cultures microbiennes.

Jusqu'à ces dernières années, pour caractériser cette substance, les bactériologistes utilisaient généralement une réaction basée sur la formation de nitroso-insol. Cette réaction se pratique le plus souvent suivant la technique adoptée par Kitasato (1) lors de ses premières recherches sur les microbes indologènes, c'est-à-dire qu'à 10 cc. d'une culture en bouillon ou en eau peptonée on ajoute 1 cc. d'une solution aqueuse de nitrite de sodium ou de potassium à 0,2 pour 1.000, puis quelques gouttes d'acide chlorhydrique à 22° ou d'acide sulfurique à 66°. Une coloration rouge ou rose indique la présence d'indol ; la sensibilité de la réaction peut être accrue en rassemblant dans l'alcool amylique le nitroso-indol formé.

Bien que ce procédé de recherche soit encore employé très fréquemment, depuis 1901, on tend de plus en plus à lui substituer la réaction d'Ehrlich au p. diméthylaminobenzaldéhyde qui est d'une extrême sensibilité (2). Dans les laboratoires de bactériologie on l'effectue généralement en ajoutant à 10 cc. d'une culture, en bouillon ou eau peptonée, quelques centimètres cubes d'une solution alcoolique de diméthylaminobenzaldéhyde à 2 0/0, puis avec précaution quelques gouttes d'acide chlorhydrique ou d'acide sulfurique concentré. Certains expérimentateurs croient utile d'ajouter un persulfate ou un nitrite alcalin ou de faire la réaction à chaud.

Bien d'autres réactions permettent, comme on le sait, de caractériser l'indol, mais je ne m'en occuperai point ici car leur emploi est rarement utile dans le cas qui nous occupe. Je préfère m'en tenir aux deux que je viens de citer et montrer combien la valeur des résultats qu'elles fournissent dépend des conditions dans lesquelles elles sont effectuées.

Pendant longtemps on s'est contenté d'ajouter directement aux cultures du nitrite de sodium et de l'acide, puis, pour déceler les très petites quantités d'indol, on eut l'idée de caractériser ce composé non plus dans les cultures mêmes, mais dans leur distillat.

1. Kitasato, « Die negative Indol-Reaktion der Typhusbazillen im Gegensatz zu anderen ähnlichen Bazillenarten », *Zeitschr. f. Hygiene*, t. VII, 1889, p. 515.

2. Ehrlich, « Ueber die Dimethylaminobenzaldehyd-Reaktion », *Deutsch. Med. Wochenschrift*, 1901, n° 15.

Cette manière de faire avait en même temps l'avantage de supprimer une importante cause d'erreur surtout avec les réactifs modernes ; avec elle on évitait de pratiquer la recherche de l'indol en présence de certaines substances qui existent dans les cultures et qui peuvent donner lieu à des colorations gênantes. De nombreux auteurs, et notamment Steensma, montrèrent l'intérêt qu'il y avait de préférer à toute autre technique la distillation des cultures ; pourtant celle-ci ne méritait guère, ainsi que nous allons le voir, la confiance qu'ils lui accordaient.

Porcher et Panisset (1) ont établi, en effet, que dans les cultures microbiennes, même d'espèces ne donnant pas d'indol, peuvent se former certaines substances, qui ont comme caractère commun de se décomposer facilement en donnant de l'indol ; or, l'une d'elles, l'acide indolcarbonique, se dissocie même lorsqu'on porte simplement sa solution aqueuse à l'ébullition. La présence de tels composés indologènes rend donc illusoire la précaution que l'on prenait de distiller les cultures et pour extraire l'indol qui peut se trouver dans celles-ci il apparaît indispensable d'avoir recours à d'autres procédés qu'à l'entraînement par la vapeur d'eau. Celui qui convient le mieux est certainement l'épuisement des liquides à analyser par l'éther convenablement purifié.

Porcher et Panisset ont donc eu le mérite de révéler une grave cause d'erreur dans l'étude de la fonction indologène des microbes et de rappeler en même temps aux bactériologistes qu'on ne doit jamais caractériser directement un corps dans une culture microbienne. Malheureusement leurs conseils n'ont pas été suivis comme ils le méritaient, à tel point que les résultats obtenus par Steensma, en 1906, sont sûrement plus près de la vérité que ceux publiés dans nombre de travaux récents.

En effet, certains auteurs, ennemis de ce qu'ils appellent dédaigneusement des complications, considèrent comme très suffisant de rechercher l'indol en pratiquant la réaction d'Ehrlich directement dans les cultures. Pas plus qu'ils ne s'inquiètent des recommandations de Porcher et de Gauthier, ils ne tiennent aucun

1. Ch. Porcher, « Des corps indologènes dans l'urine », *C. R. de l'Acad. d. Sciences*, 3 mai 1909.

Ch. Porcher et L. Panisset, « Recherche de l'indol dans les bouillons microbiens », *C. R. de la Soc. de Biologie*, 24 août 1909. « Des composés indologènes dans les cultures liquides », *C. R. de l'Acad. des Sciences*, 17 mai 1909.

compte des travaux des nombreux chimistes (1) qui ont montré que le diméthylaminobenzaldéhyde donne avec diverses substances, existant normalement dans la plupart des cultures microbiennes et même dans certains milieux stériles, des colorations très difficiles à distinguer de celles que produisent l'indol et le scatol.

Il n'est d'ailleurs pas besoin de connaître les travaux que je viens de signaler, pour se rendre compte des précautions qu'impose l'usage du diméthylaminobenzaldéhyde ; il suffit de se conduire en expérimentateur consciencieux et de ne pas adopter un réactif aussi sensible sans avoir vu ce qu'il donne avec des milieux témoins. Si les auteurs dont je parle plus haut avaient pris ce soin ils auraient vu que certains milieux usuels et les solutions de certaines peptones, stériles ou ensemencés avec des microbes non producteurs d'indol, donnent, lorsqu'on les traite directement avec le réactif d'Ehrlich, des colorations très variées allant du bleu au rouge groseille en passant par toutes les teintes du violet. Je veux croire qu'en présence de constatations de cette sorte ils n'auraient pas adopté une telle manière de procéder et auraient cherché un moyen d'éviter des causes d'erreur aussi évidentes. Il faut croire toutefois que la nécessité des témoins et des expériences à blanc, n'est pas encore admise par tout le monde, car j'ai eu maintes fois l'occasion de voir employer le procédé simpliste dont, après tant d'autres, je viens de montrer les inconvénients (1).

Quoi qu'il en soit, l'exemple est assez curieux des mauvais résultats que peut donner, lorsqu'elle est utilisée sans précaution, une

1. Steensma, « Ueber Farbenreaktionen der Eiweisskörper... mit aromatischen Aldehyden und Nitriten », *Zeitschr. f Physiol. Chemie*, t. XLVII, p. 25.

Steensma, « Die Farbenreaktionen in der Biochemie », *Biochem. Zeitschr.*, t. VIII, p. 203, 1908.

Fleig, « Réactions colorées du tryptophane, de l'indol, du pyrrol, etc. . avec les aldéhydes aromatiques », *C. R. de la Soc. de Biologie*, juillet 1908.

Cl. Gautier, « Réactions de la phloroglucine et de l'orcéine avec le p. diméthylaminobenzaldéhyde... » *C. R. de la Soc. de Biologie*, 23 mai 1908.

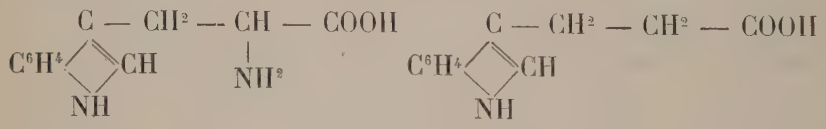
Rhode, « Die Farbenreaktionen der Eiweisskörper mit p. dimethylaminobenzaldehyd... » *Zeitschr. f. Physiol. Chemie*, t. XLIV, 1905, p. 161.

2. On trouvera dans un travail de H. Seidelin et Fr. Lewis (Somes notes on indole-reaction and allied phenomene, *Journal of Hygiene*, décembre 1911, p. 504) un exemple des pertes de temps, des incertitudes et des difficultés d'interprétation auxquelles expose la méconnaissance des faits révélés par Neubauer, Cole, Rohde, Porcher, Steensma et Gauthier.

méthode excellente et très sensible. Il est pourtant bien facile ainsi qu'on le verra plus loin, d'appliquer correctement la réaction d'Ehrlich et d'en obtenir des résultats ne prêtant guère à discussion. Bien entendu toutes les réserves que je viens de faire ne s'appliquent qu'aux travaux récents et, pour identifier des microbes appartenant à des espèces décrites depuis longtemps comme producteurs d'indol, il faudra toujours se servir du procédé au nitrite tels que l'utilisaient les anciens auteurs, quitte à compléter ou corriger leurs observations en faisant des témoins et en employant des méthodes plus rigoureuses.

Avant d'exposer le détail de mes expériences, il me paraît utile de rappeler brièvement que la production de l'indol par certains microbes est due à leur action sur le tryptophane qui existe dans la molécule de la plupart des albuminoïdes (1). On en a d'ailleurs une preuve indirecte en cultivant des espèces indologènes fortement protéolytiques dans un milieu où la gélatine représente le seul élément protéique ; celle-ci ne renfermant pas de tryptophane on ne trouve pas d'indol dans les cultures.

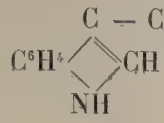
Ainsi que l'ont montré Hopkins et Cole (2), la production d'indol et de scatol aux dépens du tryptophane est le résultat d'une attaque progressive au cours de laquelle apparaissent divers corps de plus en plus simples ; ces termes de passage sont l'acide indolpropionique, l'acide indolacétique et l'acide indolcarbonique. Depuis que l'on sait définitivement que le tryptophane est l'acide indolaminopropionique on s'explique bien le mécanisme suivant lequel se forment toutes ces substances ; comme la tyrosine perd son NH^2 pour donner de l'acide p-oxyphénylpropionique le tryptophane se désamine pour donner de l'acide indol-propionique :



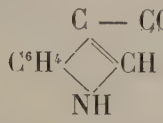
1. Voir l'excellent article de Ch. Porcher : Le tryptophane (*Biologie Médicale* juin-juillet 1909). Pour l'étude biochimique de l'indol consulter la thèse de Ch. Hervieux (*Recherches biochimiques sur l'indol*, Paris-Sciences, juin 1908).

2. Hopkins et Cole, « A contribution to the chemistry of proteids : I. Preparation of tryptophane », *Journal of Physiology*, t. XXVII, p. 418, 1901. — II. « The contribution of tryptophane and the action of bacteria upon it », *J of Physiology*, t. XXIX, p. 45, 1903.

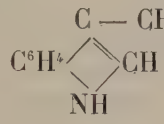
celui-ci se simplifie et donne d'abord l'acide indolacétique :



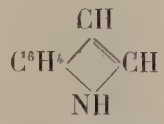
puis l'acide indolcarbonique :



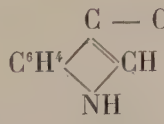
Ces deux derniers acides aboutissent alors par décarboxylation, le premier au scatol :



le second à l'indol :



Il est bon de noter en passant que l'action des microbes sur le tryptophane peut se manifester d'une tout autre façon que ci-dessus ; en effet, certains microbes s'attaquent immédiatement au carboxyle et de même que le tyrosine donne la p-oxyphényléthylamine, le tryptophane peut par décarboxylation fournir l'indoléthylamine



Enfin, étant donné ce que je viens de rappeler, on conçoit sans peine que les microbes capables d'attaquer le tryptophane, de quelque manière que ce soit, manifesteront beaucoup mieux leur action lorsqu'ils se trouvent directement en présence de cet acide aminé libre et qu'ils n'auront pas à le séparer d'un édifice moléculaire le plus souvent très complexe.

Comme l'on sait que le meilleur procédé de préparation du tryptophane consiste dans la digestion tryptique, aseptique et prolongée, de matières albuminoïdes convenablement choisies, on doit

donc, pour préparer les milieux destinés à l'étude de la fonction indologène, donner la préférence aux « peptones pancréatiques », particulièrement à celles de caséine. Toutefois, il vaut encore mieux, comme je vais le montrer, employer des milieux de composition bien définie auxquels on incorpore du tryptophane.

Il y a quelques mois (1), j'ai rapporté sommairement les résultats que j'avais obtenus en examinant 57 races de *Proteus vulgaris* au point de vue de leur fonction indologène ; je vais maintenant les exposer plus complètement, tels que je les ai confirmés par l'étude de quatre autres échantillons, en précisant autant que possible les conditions dans lesquelles mes recherches ont été réalisées.

J'ai d'abord ensemencé tous mes *Proteus* dans de l'eau peptonée à 20 pour 1.000. Celle-ci était préparée avec une peptone commerciale obtenue par digestion tryptique de la viande et donnant nettement avec l'eau de brome la réaction du tryptophane ; comme l'extrait éthéré de cette même peptone donnait une légère coloration rose avec le réactif d'Ehrlich je prenais la précaution, indiquée par Porcher, de réduire au cinquième de son volume, par une vive ébullition à l'air libre, la solution à 20 pour 1.000. Après avoir rétabli, par addition d'eau distillée, le volume primitif de celle-ci, je la neutralisais par la soude ; j'avais ainsi une eau peptonée débarrassée des traces d'indol décelables par le diméthylaminobenzaldéhyde. J'ai donc cultivé sur ce milieu les 61 *Proteus* dont je disposais et, après 24 heures de séjour à 37°, j'ai recherché l'indol dans les cultures par le procédé suivant :

1° Opérer sur 10 à 15 cc. de culture : prendre la réaction de celle-ci au papier de tournesol et, si besoin est, l'additionner de quelques gouttes de lessive de soude pour l'*alcaliniser franchement*.

2° Ajouter à la culture contenue dans un tube à essai son volume d'éther purifié spécialement (2) ; agiter doucement pendant quelques minutes,

1. Albert Berthelot, « Recherches sur quelques caractères spécifiques du *Proteus vulgaris* » *C. R. de la Soc. de Biol.*, 15 mars 1913, t. LXXIV, p. 575.
Albert Berthelot, « Recherches sur le *Proteus vulgaris* considéré comme producteur d'indol », *C. R. de l'Acad. d. Sciences*, 24 févr. 1913, t. CLVI, p. 641.

2. Sur la nécessité et la technique de cette purification voir la thèse de Louis Gauthier (page 20) ; pour purifier l'éther je me contente ordinairement de le laver avec le tiers de son volume d'une solution de soude à 5 0/0, puis, à deux reprises avec de l'eau distillée.

puis laisser déposer jusqu'à ce que la couche éthérée soit bien limpide, au moins dans la moitié supérieure de sa hauteur — dans le cas d'une émulsion par trop stable, disloquer celle ci par addition de quelques gouttes d'alcool.

3° Avec un tube à effilure courte dont on se sert à la manière d'un tâte-vin, prélever en s'y reprenant à plusieurs reprises, quelques centimètres cubes de la solution éthérée, en prenant bien garde de n'entraîner aucune gouttelette du milieu de culture (1).

4° Aux trois ou quatre centimètres cubes d'éther ainsi recueillis dans un tube à essai, ajouter le quart de leur volume d'une solution de p diméthylaminobenzaldéhyde à 4 0/0, dans l'alcool à 96°; agiter pour bien mélanger les deux liqueurs.

5° A l'aide d'un tube effilé faire arriver lentement au fond du tube renfermant le mélange solution éthérée + réactif, deux ou trois centimètres cubes d'acide chlorhydrique. Laisser reposer cinq minutes; examiner alors le tube devant un fond blanc. La présence d'indol dans la culture examinée est caractérisée par l'apparition d'un anneau rouge légèrement violacé dans la zone de contact des deux liqueurs; lorsque la proportion d'indol est assez forte la coloration s'étend à toute la couche inférieure Une teinte plus violacée, une tendance vers le bleu s'accusant avec le temps est l'indice de la présence de scatol (2) ou tout au moins d'un mélange de ce corps avec l'indol; bien entendu, dans ce cas, on ne doit pas s'en tenir à cette simple coloration et il faut utiliser les réactions différentielles plus nettes, qui sont fort bien exposées dans la thèse d'Hervieux.

Le procédé que je viens de décrire est moins rationnel que celui de L. Gauthier, mais, ainsi que je l'ai maintes fois vérifié, il fournit des résultats *qualitatifs* tout aussi exacts. Son seul point délicat réside dans la séparation de la solution éthérée, bien que, lorsqu'on opère avec soin, il soit impossible d'entraîner des gouttelettes aqueuses avec l'éther.

Il est d'ailleurs très simple de se mettre à l'abri de toute cause d'erreur de cette sorte en agitant doucement, dans un tube étroit, les quelques centimètres cubes de liqueur éthérée avec leur volume d'eau légèrement alcalinisée par la soude; en laissant reposer pendant quelques instants il est alors facile de puiser avec une pipette effilée une quantité suffisante de solution éthérée tota-

1. Quand on opère sur un petit volume de culture il est très commode, ainsi que mon collègue M. D. M. Bertrand en a eu l'idée, d'employer une pipette de Wright à tétine de caoutchouc.

2. Avec le scatol seul la teinte primitivement violette devient complètement bleue en trente minutes.

lement exempte d'impuretés capables de donner une coloration avec le réactif d'Ehrlich. Même en prenant l'excès de précautions que je viens d'indiquer il ne m'a jamais fallu plus de dix minutes pour rechercher l'indol dans une culture ; comme la technique que j'ai employée ne nécessite qu'un très petit volume de culture et qu'elle fournit d'emblée des résultats ne prêtant pratiquement pas à discussion, elle me semble susceptible de rendre quelques services aux bactériologistes.

J'ai donc examiné avec cette méthode les cultures de 24 heures de mes *Proteus*, sur peptone pancréatique de viande, et j'ai constaté que seulement vingt-quatre d'entre elles contenaient l'indol. En présence de ce résultat j'ai ensemencé les échantillons qui ne donnaient pas d'indol dans plusieurs séries de tubes du même milieu et j'ai analysé les cultures après 2. 4 et 8 jours d'étuve ; cette fois encore je n'ai pu trouver trace d'indol.

Mais dès le deuxième jour, les cultures de sept de ces *Proteus* non producteurs d'indol ont pris une teinte rose lorsque j'y ai ajouté les proportions habituelles de nitrite de potassium et d'acide chlorhydrique alors que toutes les autres restaient incolores. Les résultats obtenus par Herter ayant attiré mon attention sur la présence possible d'acide indolacétique je n'ai pas été, comme Steensma, intrigué par la réaction colorée que me présentaient ces cultures et j'y ai recherché cette substance.

Pour cela j'ai immédiatement ensemencé chacun des *Proteus* non indologènes dans 750 cc. d'eau peptonée et, au bout de 48 heures, sur 50 cc. des diverses cultures, j'ai répété la réaction avec le nitrite. En même temps j'effectuais celle-ci avec de l'eau peptonée additionnée d'une part de traces d'indol, d'autre part de traces d'acide indolacétique (1). J'ai remarqué immédiatement que les cultures de *Proteus* et l'eau peptonée chargée d'acide indolacétique prenaient une teinte rosée légèrement violacée, peu accusée, tandis que l'eau peptonée chargée d'indol se colorait nettement en rouge. Dans toutes ces liqueurs j'ai extrait la substance colorante avec le même volume d'alcool amylique. Les différences de coloration se sont encore accusées ; j'ai alors dilué avec de l'alcool amylique les solutions trop foncées de manière à les amener à peu près à la même intensité colorante et je les ai examinées au spectroscope.

J'ai constaté que les solutions amyliques provenant de cultures de

1. Je dois cette substance à l'obligeance de la Badische Anilin und Soda Fabrik.

Proteus non indologènes et d'eau peptonée chargée d'acide indolacétique donnaient pour une même épaisseur un spectre caractérisé par une bande d'absorption dans le vert bien accusée entre les longueurs d'onde $\lambda = 560$ et $\lambda = 530$ se dégradant vers le jaune jusqu'à $\lambda = 575$ et vers le bleu jusqu'à $\lambda = 515$, tandis que la solution amylique de nitrosoindol absorbait le vert, le bleu, l'indigo et le violet du spectre à partir de la longueur d'onde $\lambda = 565$, l'absorption commençant même au voisinage de $\lambda = 582$.

Par l'examen spectroscopique il semblait donc bien probable que les *Proteus* qui donnaient une réaction colorée avec le nitrite étaient simplement des producteurs d'acide indolacétique. Je m'en suis assuré de la façon suivante : Les 700 cc. de culture qui me restaient après l'épreuve spectroscopique ont été *légèrement acidifiés* par l'acide sulfurique et épuisés par l'éther dans une boule à décantation ; la liqueur éthérée (500 cc. environ) a été réduite au cinquième par distillation et agitée avec la moitié de son volume (50 cc. environ) d'eau faiblement alcalinisée par la soude. La liqueur aqueuse décantée, additionnée d'acide chlorhydrique jusqu'à très faible réaction acide, a été maintenue quelques instants à 45° pour chasser l'éther dissous.

De petites portions des liqueurs aqueuses ainsi obtenues pour les 7 *Proteus* ont alors été examinées en même temps qu'une solution aqueuse d'acide indol-3-acétique à 1 pour 1.000 ; toutes m'ont donné un résultat positif avec les réactions considérées par Salkowsky et Herter (1) comme caractéristiques :

1° Avec HCl et NO^2K production d'une coloration rose passant complètement dans l'alcool amylique et donnant une bande d'absorption dans le vert.

2° Avec HCl et *traces* de Fe^6Cl^6 production d'une coloration voisine du rouge cerise.

J'ai alors épuisé par l'éther le reste des solutions légèrement acides, dont j'avais utilisé une très faible partie pour les réactions ci-dessus, et j'ai concentré par distillation les liqueurs éthérées résultant de cet épuisement. J'ai versé le résidu de ces distillations dans des petits ballons à fond rond et j'ai chassé le reste d'éther en les maintenant à 60°. A ce moment j'ai placé les ballons sur un bain de sable que j'ai maintenu à 110-115° pour chasser l'eau que l'évaporation avait laissée, puis j'ai élevé la température à 210°, mais en ayant soin de ne chauffer que le fond des ballons, c'est-à-dire la partie sur laquelle existait un léger résidu. Après 10 minutes de chauffage, j'ai laissé refroidir les ballons et j'ai repris par quelques centimètres cubes d'alcool le léger enduit qui se trouvait sur leurs parois ; j'ai traité la solution alcoolique ainsi obtenue par le réactif d'Ehrlich et

1. C. A. Herter, « On indolacetic acid », *Journal of biological Chem.*, t. IV, 1908, p. 254.

l'acide chlorhydrique. Toutes contenaient du scatol car elles m'ont donné une coloration violacée d'abord peu accentuée, mais qui a foncé rapidement et s'est changée assez vite en une teinte bleue présentant un spectre d'absorption parfaitement caractéristique. L'existence de ce scatol, qui se forme quand on chauffe à sec vers 200° l'acide indolacétique, était une preuve de la présence de cette substance dans les liqueurs que je venais d'examiner.

J'avais donc établi par trois réactions qu'il s'agissait bien d'acide indol- 3 -acétique, confirmant en somme les faits observés par Herter et Ten Broeck avec seulement deux races de *Proteus*.

Pour me placer dans de meilleures conditions j'ai répété l'expérience que je viens de décrire en substituant à la peptone de viande une peptone tryptique de caséine que je devais à l'obligeance de M. P. Macquaire ; les résultats ont été exactement les mêmes que dans le premier cas : 24 *Proteus* producteurs d'indol, 37 *Proteus* non indologènes dont 7 producteurs d'acide indolacétique.

J'ai alors voulu rechercher si une variation plus importante dans la composition du milieu ne modifierait pas ces résultats. Pour cela j'ai utilisé un mélange de produits abiurétiques obtenus par l'hydrolyse chlorhydrique de la caséine, mais comme l'action des acides ne convient pas à la séparation du tryptophane j'avais soin d'ajouter à ce mélange, bien décoloré par le noir animal, 1 0/0 de tryptophane ; avec cet ensemble de constituants de la caséine je préparais des solutions à 20 pour 1.000 qui constituaient un milieu dans lequel le *Proteus* se développait remarquablement bien. Dans ces conditions les résultats ont été identiques en ce qui concerne la production d'indol, tout en moins qualitativement, mais le nombre des échantillons producteurs d'acide indolacétique est passé de 7 à 19 ; en même temps j'ai noté que, tant pour l'indol que pour l'acide indolacétique, la production de ces substances était beaucoup plus intense qu'en milieu peptoné.

Ces faits m'ont conduit à me servir d'un milieu encore mieux adapté à l'étude de la fonction indologène, plus riche par conséquent en substances mères de l'indol et de l'acide indolacétique, c'est-à-dire en tryptophane. J'ai d'abord utilisé un milieu chimiquement défini dont j'avais déjà indiqué la composition (1) et qui

1. Albert Berthelot, « Sur l'emploi de milieux chimiquement définis à base de tryptophane », *C. R. de la Soc. de Biol.*, 20 avril 1912, t. LXXII, p. 595.

renfermait avec 1,5 pour 1.000 de tryptophane. divers autres acides aminés et des sels, mais je l'ai abandonné pour l'étude du *Proteus*, car certains de ces éléments indispensables pour nombre de microbes étaient inutiles pour une espèce protéolytique et d'une telle activité biochimique.

Pour les expériences qui vont suivre il m'a donc paru plus simple d'imiter Hopkins et Cole et d'ajouter de la gélatine à une solution nutritive analogue à celle que j'ai préconisée lors de mes premières recherches sur les microbes acidaminolytiques de la flore intestinale. La gélatine ne renfermant pas de tryptophane, le *Proteus* n'avait donc à sa disposition que celui existant à l'état libre dans le milieu, qui présentait la composition suivante :

Eau	1.000,00
Phosphate dipotassique . . .	1,50
Sulfate de magnésium . . .	0,50
Tryptophane	1,50
Chlorure de calcium	0,02
Gélatine	25,00

Grâce à l'amabilité de M. F. Hoffmann-La Roche qui avait mis à ma disposition une quantité assez importante de tryptophane parfaitement pur j'ai pu étudier l'action de toutes mes races de *Proteus* sur cet acide aminé.

J'ai examiné une première série de cultures après 48 heures de séjour à 37° et j'ai constaté que le nombre des échantillons producteurs d'indol était le même que dans les essais précédents, par contre il y avait 31 *Proteus* producteurs d'acide indolacétique. D'autres cultures examinées après quatre jours d'étuve m'ont donné les mêmes résultats pour l'indol, mais cette fois tous les *Proteus* non indologènes avaient produit de l'acide indolacétique. Je ne m'en suis pas tenu là et j'ai recherché si les échantillons qui avaient donné de l'indol, n'avaient pas produit en même temps de l'acide indolacétique. Pour cela après avoir alcalinisé par la soude les cultures sur milieu au tryptophane chargées d'indol, je les ai épuisées par l'éther jusqu'à ce que ce dissolvant ne m'ait plus donné de coloration avec le réactif d'Ehrlich ; après cette opération je pus déjà observer sur une petite portion de ces cultures complètement débarrassées d'indol qu'elles prenaient une coloration rose par addition de nitrite et d'acide chlorhydrique, alors qu'un tube témoin du milieu stérile n'accusait qu'une légère teinte jaune. Je

soumis alors ces mêmes cultures à un nouvel épuisement par l'éther après les avoir acidifiées et, après concentration de ce solvant, il me fut facile de constater la présence d'acide indolacétique.

En résumé, mes 61 *Proteus* cultivés sur tryptophane se montraient tous producteurs d'acide indolacétique au bout de quatre jours, tandis que seulement 24 d'entre eux étaient capables de former de l'indol. Ces résultats auraient pu me faire croire à l'existence de deux variétés de *Proteus* ; mais en présence des variations de ce microbe sous l'influence du milieu, j'ai pensé qu'il devait plutôt s'agir de races différant simplement par une intensité plus ou moins grande de leur action sur le tryptophane ou les substances qui en renferment, action beaucoup trop variable pour que ses divers degrés puissent être utilisés comme caractères différentiels. Je n'ai pas tardé à m'apercevoir combien cette hypothèse était exacte.

En effet, au mois d'octobre 1912, j'ai examiné à nouveau 24 *Proteus* de diarrhées infantiles que j'avais étudiés au mois de février de la même année et qui avaient subi de nombreux passages en gélatine préparée avec du bouillon Martin ; bien que je me sois placé dans les mêmes conditions et que j'aie utilisé le même milieu (solution de peptone pancréatique de viande à 20 pour 1.000), j'ai constaté que 6 *Proteus* qui primitivement produisaient de l'indol et de l'acide indolacétique ne donnaient plus que de ce dernier corps, tandis que 11 autres qui ne formaient que de l'acide indolacétique étaient devenus également producteurs d'indol. Le *Proteus vulgaris* présentait donc bien la grande variabilité d'action que je lui attribuais *a priori* et qui me faisait paraître peu probable l'existence de races bien fixées au point de vue du pouvoir indologène.

Ayant ainsi observé une variation spontanée de ce caractère du *Proteus*, j'ai essayé d'obtenir plus rapidement une modification analogue. Dans ce but j'ai pris au hasard parmi les échantillons dont l'expérience précédente m'avait montré la fixité d'action, 3 *Proteus* qui m'avaient toujours donné de l'indol, en solution de peptone pancréatique de viande, et 3 autres qui au contraire n'avaient jamais produit que de l'acide indolacétique. Je les ai ensemencés en même temps dans une solution de peptone pancréatique de caséine à 3 pour 100, dans une solution renfermant, avec les sels habituels 2 pour 1.000 de tryptophane avec seule-

ment 5 pour 1.000 de gélatine et enfin dans une solution à 20 pour 1.000 de l'ensemble des acides aminés qui entrent dans la constitution de la molécule de caséine.

J'ai examiné les cultures au bout de 72 heures de séjour à 37° et j'ai constaté que sur peptone de caséine les 6 échantillons donnaient de l'acide indolacétique et qu'un seul des 3 indologènes donnait de l'indol. Au contraire, sur les deux autres milieux, tous les échantillons donnaient à la fois de l'indol et de l'acide indolacétique. Enfin, j'ai analysé de nouveau, après 15 jours d'étuve, les cultures sur peptone de caséine, mais j'ai obtenu les mêmes résultats, c'est-à-dire qu'une seule renfermait de l'indol. Pendant un mois j'ai continué à cultiver ces 6 *Proteus* sur les trois milieux, et après leur avoir ainsi fait subir six passages, j'ai constaté que leur action respective sur le tryptophane ne s'était pas modifiée. Par conséquent sur six échantillons un seul avait gardé ses propriétés primitives, trois autres semblaient avoir acquis, dans les milieux contenant du tryptophane libre, la faculté de produire de l'indol, tandis que les deux derniers, en passant par la solution de peptone de caséine, avaient perdu leur pouvoir indologène. En présence de ces faits il était intéressant de rechercher si les propriétés des *Proteus* ainsi cultivés en milieux spéciaux étaient modifiés définitivement ou s'il s'agissait simplement de variations apparentes essentiellement dépendantes de la composition du milieu. C'est ce que j'ai fait en ensemençant à nouveau dans une solution à 20 pour 1.000 de peptone de viande les 5 échantillons dont les caractères semblaient avoir varié ; j'ai alors constaté que les deux races qui avaient perdu leur pouvoir indologène ne le recouvraient pas dans le milieu primitif et que les trois autres, devenues capables de produire de l'indol, ne donnaient plus dans ce milieu que de l'acide indolacétique, ainsi qu'elles le faisaient antérieurement.

Si j'avais borné là mes recherches j'aurais pu tout au moins conclure à la possibilité de variations regressives stables, mais connaissant l'extrême variabilité du *Proteus* j'ai continué à étudier les races que j'avais utilisées pour mes dernières expériences. J'ai repiqué ces 6 *Proteus* sur gélatine au bouillon Martin et après 8 passages effectués en deux mois, j'ai examiné de nouveau leurs cultures en solution de peptone de viande (72 heures à 37°). Dans ces conditions j'ai observé que les 6 échantillons avaient repris leurs propriétés primitives, c'est-à-dire que tous donnaient de l'acide indolacétique et que les trois anciens producteurs d'indol

en formaient comme par le passé. Les variations apparentes du pouvoir indologène que j'avais déterminées brusquement n'étaient donc bien que des modifications essentiellement transitoires.

Enfin, j'ai étudié plus complètement l'action de ces 6 *Proteus* sur le tryptophane, à l'aide des cultures obtenues en présence de 2 pour 1.000 de cet aminoïque et de 5 pour 1.000 de gélatine. Ainsi que je l'ai déjà dit, dans ce milieu, après 72 heures à 37°, les 6 échantillons ont produit de l'indol et de l'acide indolacétique. J'ai laissé séjourner des cultures à l'étuve, pendant encore 15 jours et au bout de ce temps j'y ai trouvé beaucoup plus d'indol ; par contre c'est à peine si j'ai pu y caractériser l'acide indolacétique, alors que cette substance existait en forte proportion dans les jeunes cultures.

Toutefois si l'acide indolacétique avait presque complètement disparu, peut-être l'indol était-il accompagné d'un autre dérivé plus simple du tryptophane ? Par la recherche même de l'indol j'avais la preuve que mes cultures ne renfermaient pas de scatol, mais peut-être contenaient-elles de l'acide indol-carbonique, cette substance indologène dont Porcher a montré la présence dans les cultures de certains microbes ?

Pour m'en rendre compte j'ai employé ce qui me restait de mes six cultures de 15 jours sur tryptophane ; à ce moment elles étaient déjà complètement débarrassées de leur indol par des lavages à l'éther, en présence d'un léger excès de soude. Je les ai *exactement neutralisées* avec HCl et je les ai distillées : les 6 distillats contenaient de l'indol que j'ai caractérisé par le diméthylaminobenzaldéhyde et la formation du dérivé nitrosé ; le liquide distillé renfermait donc de l'acide indol-carbonique. Dans le résidu de ces distillations j'ai retrouvé les traces d'acide indol-acétique dont j'avais antérieurement constaté la présence. J'ai extrait cette substance en épuisant par l'éther la liqueur légèrement acidifiée ; j'ai débarrassé celle-ci de l'excès d'éther en la chauffant quelques instants au bain-marie, puis après l'avoir étendue d'eau, je l'ai filtrée sur bougie de porcelaine. Dans le filtrat ainsi obtenu, avec l'eau de brome et le réactif glyoxylique, j'ai obtenu pour les six cultures, les réactions caractéristiques du tryptophane ; tout cet acide aminé n'avait donc pas été détruit en quinze jours par le *Proteus*.

Quant à l'acide indol-carbonique sa présence, à côté de l'indol et de traces d'acide indol-acétique, est incontestable, car j'ai vérifié que la distillation de 200 cc. de milieu au tryptophane additionné

de 5 centigrammes d'acide indol-acétique et exactement neutralisé donnait un distillat ne réagissant en aucune façon avec le diméthylaminobenzaldéhyde, tandis que dans les mêmes conditions 5 centigrammes d'acide indol-carbonique (marque Badische Anilin u. Soda Fabrik.) produisaient une quantité notable d'indol.

Ayant constaté que le *Proteus* peut donner de l'acide indol-carbonique, j'ai recherché cette susbtance dans des cultures de tout âge en eau peptonée ou en milieu aux acides aminés de la caséine, ainsi que dans des cultures jeunes sur tryptophane ; bien que mes essais aient porté sur les six races de mes dernières expériences, je n'en ai pas trouvé par le procédé que je viens d'indiquer. Ce corps me semble exister surtout dans les vieilles cultures en milieu particulièrement favorable ; en pratique, au point de vue du simple diagnostic bactériologique, il n'y a donc guère lieu de s'en inquiéter.

On a pu remarquer, que dans mes recherches, j'ai négligé l'acide indol-propionique ; je tiens à faire observer que j'avais des raisons d'agir ainsi. En effet, toutes mes cultures ont été effectuées au large contact de l'air ; par conséquent, en admettant que le *Proteus* ait pu produire ce corps aux dépens du tryptophane, jamais il n'aurait trouvé dans mes expériences les conditions d'anaérobiose nécessaires. D'ailleurs, aucune de mes cultures, ainsi que je l'ai établi en recherchant l'indol, ne renfermait de scatol, composé qui accompagne ordinairement l'acide indol-propionique dans la destruction anaérobie dû tryptophane par certains microbes.

J'aurais dû, pour être complet, rechercher également s'il y avait formation d'indoléthylamine ; si je ne l'ai point fait, c'est que la recherche de cette substance ne peut s'effectuer par des méthodes aussi simples que la caractérisation de l'indol, du scatol et des acides à noyau indolique. L'examen de ce point de la biochimie du *Proteus* m'aurait du reste trop écarté de l'étude critique du pouvoir indologène et j'ai préféré le réserver pour des recherches ultérieures.

Enfin, je tiens à insister sur ce fait que toutes les cultures dont je me suis servi au cours de cette étude ont toujours été obtenues avec des milieux donnant, par le brome, la réaction du tryptophane libre. J'ai laissé systématiquement de côté l'étude des cultures dans lesquelles le *Proteus* aurait dû effectuer une dislocation préalable d'une molécule albuminoïde quelconque pour en libérer le tryptophane, car il m'aurait fallu tenir compte

non seulement des variations de l'activité d'attaque de cet aminoacide, mais encore de la variabilité des pouvoirs protéolytique, peptolytique ou peptidolytique.

Je n'ai donc pas examiné sous toutes ses faces la question de la production d'indol par le *Proteus vulgaris*, mais comme je m'étais placé uniquement au point de vue de la diagnose précise de cette espèce, je crois avoir fait œuvre plus utile en examinant un grand nombre de races dans des conditions assez limitées, mais bien définies.

Quoi qu'il en soit, de l'ensemble de mes recherches il résulte que le *Proteus vulgaris* est un microbe qui attaque le tryptophane en donnant, par le même mécanisme que les autres aérobies étudiés par Hopkins et Cole, une série de produits dont la dégradation plus ou moins avancée marque l'intensité de son action sur la molécule aminoïque. Dans certaines cultures très âgées, en milieu contenant beaucoup de tryptophane, on peut ne trouver pratiquement que de l'indol ; dans d'autres, en général assez jeunes et sur milieu pauvre en tryptophane libre, il n'y a que de l'acide indolacétique, mais ce que l'on rencontre le plus souvent c'est à la fois de l'indol et de l'acide indolacétique en proportions variables.

L'action du *Proteus* variant non seulement avec les divers échantillons, mais même pour une race donnée, il est impossible de se baser sur l'absence d'indol dans les cultures de ce microbe pour le différencier des autres espèces. Par contre, et autant que l'on puisse conclure de l'examen de soixante-et-une races, on peut dire que tous les *Proteus vulgaris* Hauser sont capables d'attaquer le tryptophane libre et de produire, aux dépens de cet acide aminé, au moins de l'acide indol-3-acétique.

L'espèce *Bacillus proteus anindologenes* Van Loghem n'a aucune raison d'être et l'on doit considérer comme *Proteus vulgaris* Hauser tout microbe possédant, avec les autres caractères de cette espèce, la propriété de donner, à 37°, dans un des milieux que je viens d'indiquer, soit de l'indol ou de l'acide indolacétique, soit un mélange de ces deux corps (1).

1. Pour la recherche du pouvoir indologène des microbes je ne saurais trop recommander les milieux à base de tryptophane ; leur préparation ne présente plus de difficulté maintenant que cet acide aminé se trouve dans le commerce à un prix abordable (5 francs le gramme environ). Il y a cependant une précaution à prendre : exiger des fabricants un produit dont l'extrait éthéré ne réagisse en aucune façon avec le réactif d'Ehrlich et dont la solution aqueuse presque incolore ne donne aucune coloration rose ou rouge avec les nitrites et l'acide chlorhydrique dans les conditions habituelles.

DEUXIÈME PARTIE

Recherches sur l'action pathogène d'un « Proteus vulgaris ».

CHAPITRE PREMIER

VIRULENCE. TOXICITÉ DES CULTURES TOTALES STÉRILISÉES ET DES FILTRATS

En entreprenant les recherches dont l'exposé va suivre j'ai eu simplement pour but d'apporter quelques données nouvelles à l'important ensemble des connaissances que nous possédons déjà sur l'action pathogène du *Proteus*. Les nombreux travaux qui ont été publiés sur ce sujet ont été passés en revue dans différents mémoires, très documentés, parmi lesquels je citerai ceux de Bodin (1), de Herter (2) et de Meyerhof (3) ; je ne m'y attarderai donc pas et je me contenterai de rapporter les faits que j'ai observés, en précisant de mon mieux les conditions dans lesquelles ont été effectuées mes expériences.

Presque tous mes essais, et ils tirent la plus grande partie de leur intérêt de cette particularité, ont porté sur un *Proteus vul-*

1. Bodin, *Le Proteus* (étude critique), Thèse de Médecine, Paris, 1898.
2. Herter et Ten Broeck, *loc. cit.*
3. Meyerhof, « Ueber einige biologische und tierpathogene Eigenschaften der *B. Proteus* », *Centralbl. f. Bakteriologie*, t. XXIV, 1898, p. 18.

garis provenant d'un cas de diarrhée infantile. Ce microbe a été en effet, isolé, par M. Metchnikoff au cours de l'été 1911, dans les matières fécales, muqueuses et acides, d'un nourrisson de sept mois atteint d'une gastro-entérite aiguë. Je le désignerai par les lettres (Tx) pour le distinguer d'un autre échantillon (PV) isolé par M. H. Tissier d'une putréfaction de viande et que j'ai utilisé pour quelques expériences comparatives.

J'exposerai successivement les résultats que j'ai obtenus relativement à la toxicité des cultures totales en milieux liquides, des filtrats de ces cultures, des corps microbiens diversement traités, des autolysats et des poisons endocellulaires ; puis je terminerai cette seconde partie de mon travail par la relation de quelques faits concernant l'immunisation contre le *Proteus* et l'action anti-infectieuse de la choline et de la neurine.

A. — Virulence du « Proteus Tx ».

Avant d'étudier les facteurs de toxicité du *Proteus Tx* j'ai déterminé approximativement sa virulence. J'ai utilisé pour cela des cultures en bouillon Martin, c'est-à-dire dans un mélange à parties égales de peptone Martin et de bouillon de viande non peptoné. Voici les résultats que j'ai obtenus :

a) *Cultures de 48 heures, à 37°.*

1° *Cobaye* (Animaux d'un poids moyen de 500 grammes).

Inoculation sous-cutanée : une dose de 2 cc. déterminait localement une assez forte réaction inflammatoire dont il ne persistait, après 15 jours, d'autre trace qu'un petit nodule induré.

Inoculation intra-péritonéale : avec 1 cc. on déterminait la mort en 5 à 7 jours ; avec 2 cc. les animaux succombaient en 48 heures.

Inoculation intra-veineuse (dans la jugulaire) : une dose de 1 cc. provoquait la mort en 48 heures environ ; avec 1/2 cc. les animaux ne succombaient guère qu'au bout de trois jours.

2° *Lapin* (Animaux d'un poids moyen de 2.000 grammes).

Inoculation sous-cutanée : avec 5 cc. : abcès, suppuration, cachexie et mort de l'animal à la fin de la troisième semaine ; avec

2 cc. tuméfaction qui diminuait lentement pour ne laisser vers le quinzième jour qu'un gros noyau induré.

Inoculation intra-péritonéale : avec 2 cc. mort en 8 jours ; avec 3 cc. mort en 5 jours. Au cours des deux dernières journées les animaux présentaient une très forte diarrhée.

Inoculation intra-veineuse : 2 cc. déterminaient la mort en 36 heures environ ; avec 1 cc. les animaux succombaient également, mais seulement vers le quatrième jour.

Cultures de 7 jours, à 37°.

1° *Cobaye.*

Inoculation sous-cutanée : Mort vers le sixième jour avec une dose de 2 cc.

Inoculation intra-péritonéale : Mort en 3 à 4 jours avec 1/2 cc.

Inoculation intra-veineuse : Mort en 18-24 heures avec 1/2 cc.

2° *Lapin.*

Inoculation sous-cutanée : Avec 5 cc. mort en 5 jours ; avec 2 cc. : abcès, suppuration et mort du 11e au 13e jour.

Inoculation intra-péritonéale : Avec 2 cc. mort en 4 jours environ.

Inoculation intra-veineuse : Une dose de 1 cc. suffisait pour déterminer la mort en moins de 48 heures.

Les cultures de 7 jours en bouillon Martin se sont donc montrées notablement plus virulentes que les cultures de 48 heures.

b) *Emulsion de corps microbiens vivants.*

J'ai également étudié la virulence du *Proteus Tx* inoculé sous forme d'émulsion de jeunes corps microbiens. J'ensemençais ce microbe sur gélose ordinaire inclinée, exempte d'eau de condensation, et au bout de 24 heures de séjour à 37° je délayais la culture obtenue dans 10 cc. d'eau physiologique. Cette dilution correspondait sensiblement à une teneur de 2 milligrammes de microbes secs — soit environ 10 milligrammes de corps microbiens frais — par centimètre cube.

J'ai éprouvé cette émulsion par *inoculation intrapéritonéale* et j'ai constaté ce qui suit :

1° *Cobaye* (Poids moyen : 500 grammes).

Un demi centimètre cube, soit approximativement 5 milligram-

mes de microbes pesés humides constituait la dose suffisante pour provoquer la mort en 24 à 36 heures à la suite d'une violente péritonite.

2° *Lapin* (Poids moyen : 2.000 grammes).

Avec le lapin, la dose nécessaire pour déterminer la mort des animaux en *24 à 36 heures* s'élevait à 2 cc. d'émulsion, soit environ 20 milligrammes de microbes frais.

Comme chez le cobaye il y avait une péritonite très violente ; à l'autopsie, on trouvait en abondance le *Proteus* dans le sang du cœur, même lorsque l'ensemencement était pratiqué moins d'une heure après la mort.

B. — Toxicité des cultures totales de « Proteus Tx » en divers milieux.

Pour déterminer cette toxicité je ne me suis servi que de cultures de 7 jours stérilisées de la façon suivante :

A 30 centimètres cubes de culture retirée de l'étuve à 37° depuis quelques heures j'ajoutais 5 cc. d'éther ; j'agitais doucement pendant quelques instants, puis j'abandonnais à elle-même la culture ainsi éthérée en ayant soin de placer un bouchon de caoutchouc au-dessus de celui de coton. Après 48 heures de contact je chassais l'éther en maintenant le récipient contenant la culture plongé pendant un temps suffisant dans un bain d'eau à 40° ; à l'aide de la trompe à eau j'aidais à l'évaporation des dernières traces d'anesthésique. Je vérifiais la stérilité de la culture par un ensemencement en bouillon et c'est alors seulement que je l'utilisais.

Dans presque toutes les expériences que je vais rapporter j'ai injecté à des cobayes, dans le péritoine ou dans les veines, des doses croissantes des diverses cultures ; *pour simplifier je n'indiquerai ici que les doses qu'il m'a fallu atteindre pour provoquer, dans un temps inférieur à 24 heures, la mort d'animaux d'un poids moyen de 500 grammes.*

a) *Cultures en bouillon Martin, stérilisées par l'éther.*

Toxicité pour le cobaye (Poids moyen : 500 grammes).

Voie intra-péritonéale. — Dose mortelle 5 cc. ; mort en moins de 18 heures.

Voie intra-veineuse. — Dose mortelle 2 cc. 5; mort en moins de 18 heures.

b) *Cultures obtenues avec une solution des produits abiurétiques* (1) *d'hydrolyse acide de la caséine, stérilisée par l'éther.*

Le milieu employé pour cette expérience était une solution aqueuse à 15 pour 1.000 d'un mélange des acides aminés qui constituent la molécule de caséine.

J'avais préparé ce complexe en hydrolysant à l'ébullition par l'acide sulfurique dilué la caséine commerciale dégraissée. L'hydrolyse avait été poursuivie jusqu'à disparition de la réaction du biuret ; l'acide sulfurique avait été déplacé par la baryte. La liqueur contenant les produits abiurétiques ainsi libérés avait été évaporée à siccité dans le vide à 50°, après traitement par le noir animal ; au produit de cette évaporation j'avais ajouté 1 0/0 de tryptophane et finalement j'avais obtenu une poudre presque blanche, donnant, à la dose de 15 pour 1.000 d'eau, une solution à peine teintée de jaune et très légèrement acide. Dans cette solution exactement neutralisée par la soude, le *Proteus* se développait rapidement et donnait des cultures très abondantes et dont la toxicité était identique à celle des cultures en bouillon Martin.

c) *Cultures en solution de peptone de caséine, stérilisées par l'éther.*

Je me suis servi d'une solution à 20 pour 1.000 d'une peptone pancréatique de caséine que M. Macquaire avait eu l'obligeance de me préparer pour mes recherches sur la fonction indologène.

Les cultures obtenues avec ce milieu étaient moins riches que celles en bouillon Martin, mais plus abondantes que celles de l'expérience précédente.

Toxicité pour le cobaye (Poids moyen 500 grammes).

1. Il me paraît bien inutile d'insister sur les avantages des milieux définis à base d'acides aminés, puisque Galimard les a exposés en détail et fort bien mis en lumière, il y a déjà plus de cinq ans (J. Galimard, *Quelques recherches nouvelles sur les cultures microbiennes en milieux chimiquement définis*, Thèse de Médecine, Lyon, 26 janvier 1907).

Voie intra-péritonéale. — Dose mortelle 3 cc. ; mort en moins de 18 heures.

Voie intra-veineuse. — Dose mortelle 2 cc. 5 ; mort en 16 heures.

d) *Cultures dans une solution d'un mélange commercial d'acides aminés de la viande, stérilisées par l'éther.*

Je me suis servi d'une solution à 20 pour 1.000 d'un produit commercial préparé d'après les indications d'Abderhalden, c'est-à-dire en soumettant de la viande à l'hydrolyse tryptique et éreptique, prolongée pendant longtemps en présence d'antiseptiques volatils. Cette solution constitue un excellent milieu de culture pour un grand nombre de microbes ; le *Proteus* s'y développe très vite et très abondamment.

Toxicité pour le cobaye (Poids moyen 500 grammes).

Voie intra-péritonéale. — Dose mortelle 3 cc. ; mort en 18 heures.

Voie intra-veineuse. — Dose mortelle 4 cc. ; mort en 6 heures.

e) *Cultures dans un milieu chimiquement défini, stérilisées par l'éther.*

Le milieu que j'ai employé avait la composition suivante :

Eau	500,00
Phosphate dipotassique	1,00
Sulfate de magnésium	0,50
Glycocolle	0,75
Aspartate de sodium	0,50
Chlorhydrate de l'acide glutamique	0,50
Alanine	0,50
Chlorhydrate d'histidine	0,50
Tyrosine	0,25
Tryptophane	0,25
Leucine	0,30
Phénylalanine	0,30
Chlorhydrate de guanidine	0,20
Créatine	0,20
Chlorhydrate de glucosamine	0,20
Cystine	0,10

Pour amener cette solution à la réaction convenable je la stérilisais à 120°, puis après refroidissement j'y ajoutais un volume déterminé à l'avance d'une solution de soude stérile. Dans le milieu ainsi préparé le *Proteus* ne donnait pas d'aussi belles cultures qu'en bouillon Martin ou que dans le milieu précédent ; mais elles étaient aussi riches que celles obtenues avec les acides aminés de la caséine.

Toxicité pour le cobaye (Poids moyen 500 grammes) (*Proteus Tx*). Cette toxicité est pratiquement nulle puisqu'il faut dépasser 10 cc. dans le péritoine et 5 cc. dans les veines.

En présence de ces résultats j'ai cultivé sur ce même milieu et sur la solution d'acides aminés de la viande un *Proteus* isolé d'une putréfaction (*Proteus PV*) sensiblement moins virulent que le *Proteus Tx* et j'ai constaté ce qui suit :

Toxicité pour le cobaye (Poids moyen 500 gr.) (*Proteus PV*).

Milieu D. — Voie intra-péritonéale. Dose mortelle 5 cc. ; mort en moins de 18 heures.

Voie intra-veineuse. — Dose mortelle 2 cc. 5 ; mort en 18 heures.

Milieu E. — Voie intra-péritonéale. Dose mortelle 1 cc. ; mort en moins de 18 heures.

Voie intra-veineuse. — Dose mortelle 4 cc. ; mort en 20 heures.

L'absence de toxicité des cultures du *Proteus Tx* dans le milieu E ne dépendait donc qu'indirectement de la composition de celui-ci.

C. — **Toxicité des filtrats.**

En même temps que j'avais stérilisé par l'éther les cultures du *Proteus Tx* destinées aux expériences que je viens de rapporter, j'avais filtré sur bougie Chamberland n° 3 des cultures de même âge obtenues dans les mêmes conditions. J'ai déterminé leur toxicité pour le cobaye de la même façon qu'avec les cultures totales et les résultats ont été les suivants :

a) *Filtrat culture en bouillon Martin.*

Toxicité pour le cobaye (Poids moyen 500 gr.).

Voie intra-péritonéale. — Dose mortelle : supérieure à 12 cc.

Voie intra-veineuse. — Dose mortelle : supérieure à 5 cc.

b) *Filtrat culture acides aminés de la caséine (hydrolyse acide).*

Toxicité pour le cobaye (Poids moyen 500 gr.).
Voie intra-péritonéale. — Dose mortelle : supérieure à 12 cc.
Voie intra-veineuse. (Non étudiée).

c) *Filtrat culture peptone de caséine.*

Toxicité pour le cobaye (Poids moyen 500 gr.).
Voie intra-péritonéale. — Dose mortelle 8 cc. ; mort en moins de 18 heures.
Voie intra-veineuse. — Dose mortelle 2 cc. 5 ; mort entre 18 et 24 heures.

d) *Filtrat culture acides aminés de la viande (Hydrolyse diastasique).*

Toxicité pour le cobaye (Poids moyen 500 gr.).
Voie intra-péritonéale. — Dose mortelle : supérieure à 12 cc.
Voie intra-veineuse. — Dose mortelle 4 cc. ; mort en 20 heures.

e) *Filtrat culture milieu chimiquement défini.*

Toxicité pour le cobaye (Poids moyen 500 gr.).
Voie intra-péritonéale. — Dose mortelle : supérieure à 10 cc.
Voie intra-veineuse. — Dose mortelle : supérieure à 5 cc.

Au point de vue de la formation de produits toxiques solubles c'est donc la peptone pancréatique de caséine qui m'a donné les meilleurs résultats.

Tito Carbone ayant montré que dans les cultures de *Proteus* on trouve des bases comme la choline, l'éthylènediamine, le gadinine et la triméthylamine j'ai essayé de déterminer la part qui revient à ces substances dans les cultures totales du *Proteus Tx.*

Dans ce but j'ai pris une culture de 7 jours en bouillon Martin, stérilisée par l'éther et dont la dose mortelle par voie intra-péritonéale était de 5 cc. pour un cobaye d'environ 500 grammes ; je l'ai additionnée de 10 volumes d'alcool à 96° et j'ai laissé reposer le mélange pendant 24 heures.

Je l'ai alors filtré sur papier pour séparer le précipité formé et

(1) Des cobayes témoins ne présentaient aucun signe d'intoxication lorsqu'on leur injectait dans les veines 5 cc. de la solution stérile de peptone de caséine.

j'ai distillé dans le vide à 50° le liquide clair obtenu. J'ai repris le résidu de cette distillation par de l'eau physiologique (1) en quantité telle que le volume de la solution ainsi obtenue soit le dixième de celui de la culture employée.

Les poisons de nature albuminoïdique ayant été précipités par l'alcool, cette solution ne renfermait guère comme substances très nocives que les substances alcaloïdiques ; elle donnait d'ailleurs un précipité avec les acides phosphotungstique ou silicotungstique et avec une solution iodo-iodurée. Je l'ai éprouvée sur le cobaye par voie intra-péritonéale et j'ai trouvé que la dose mortelle était de 4 cc. Cette dose représentant 40 cc. de la culture primitive on voit donc que les ptomaïnes ne constituaient qu'une très faible part des produits toxiques élaborés dans les cultures par le *Proteus Tx.*

(1) Solution aqueuse de NaCl à 7,5 pour 1.000.

CHAPITRE II

TOXICITÉ DES CORPS MICROBIENS

Pour toutes les expériences qui vont suivre j'ai utilisé des corps microbiens obtenus par la méthode de M. Maurice Nicolle (1), qui permet d'obtenir « rapidement des récoltes abondantes de corps bacillaires ne contenant que leur humidité normale et faciles à prélever sans entamer le support nutritif ». Toutefois je ne me suis pas servi des grandes boîtes de Pétri employées par cet auteur au cours de ses recherches sur la morve et j'ai donné la préférence aux grandes cuvettes métalliques dont il a établi le modèle avec la collaboration d'Alilaire ; elles m'ont donné toute satisfaction et ne m'ont jamais causé d'ennui au point de vue de la pureté des cultures.

Lors de mes premiers essais j'ai également employé la gélose à la viande et à la pomme de terre préconisée par M. Nicolle, mais dans la suite je me suis servi exclusivement d'un milieu qui m'a donné de bons résultats, tout en étant plus économique, car il ne nécessite pas de peptone et n'exige que 200 grammes de viande par litre. Pour le préparer j'ai appliqué la méthode générale que j'ai publiée il y a trois ans et qui est basée sur l'hydrolyse alcaline ménagée des substances albuminoïdes naturelles (2). Voici la technique que je suivais :

1. M. Nicolle, « Etudes sur la morve expérimentale du cobaye », *Ann. de l'Institut Pasteur*, août 1906, p. 626.

M Nicolle et Alilaire, « Note sur la production en grand des corps bactériens et sur leur composition chimique », *Ann. de l'Inst. Pasteur*, juillet 1909, p. 547.

2. Albert Berthelot, « Préparations des milieux de culture par l'hydrolyse alcaline ménagée des substances albuminoïdes naturelles », *C. R. de la Soc. de Biologie*, t. LXVIII, 30 avril 1910, p. 757.

Deux kilogrammes de viande de cheval hachée, bien maigre, étaient placés dans une marmite émaillée et mis en suspension dans la solution suivante :

Eau bouillante . . . . . 5 litres

Lessive de soude chimiquement pure à 36 Baumé... 135 cc.

Le tout était porté à l'autoclave et maintenu à 134 degrés pendant une heure et demie. Aussitôt le mélange sorti de l'autoclave je l'acidifiais *très légèrement* avec de l'acide chlorhydrique chimiquement pur, puis je l'abandonnais jusqu'au lendemain. Je le passais alors sur un tamis de crin de façon à séparer les débris de tendons et d'aponévroses ainsi que de petites masses d'acides gras ; j'avais ainsi une solution renfermant tous les proétiques de la viande à l'état de deutéroprotéoses, c'est-à-dire au stade de désintégration de la molécule albuminoïde le plus rapproché des peptones de Kühne.

J'ajoutais à ces cinq litres de solution le même volume d'une bouillie très fluide, passée au tamis, obtenue en délayant dans cinq litres d'eau, deux kilogrammes de pommes de terre pelées, découpées en petits fragments et cuites 30′ à l'autoclave à 120°.

Je neutralisais ce mélange, qui contenait alors une proportion de chlorure de sodium voisine de la teneur habituelle des milieux de culture, puis j'y introduisais 300 grammes de gélose. Je portais le tout à 120° pendant une heure et enfin je répartissais le milieu dans des fioles à fond plat d'un litre que je stérilisais à 120°. Dans chaque fiole je mettais environ 650 cc., c'est-à-dire le volume convenable pour une cuvette.

Le dépôt abondant que contenait ce milieu imposait naturellement la précaution de le couler très chaud dans les boîtes, en agitant le mieux possible les fioles qui le renfermaient ; mais après refroidissement sa surface était aussi solide et aussi unie que celle du milieu de M. Nicolle. De même que cette gélose il m'a constamment donné, par cuvette, un rendement moyen de 5 grammes de corps microbiens humides ; la toxicité de ceux-ci était la même avec les deux milieux.

Ces résultats concernant le *Proteus*, c'est-à-dire un microbe très facile à cultiver et possédant même d'après les travaux de certains auteurs une affinité marquée pour les protéoses, il serait prudent de faire un essai en petit avant d'utiliser ce milieu pour la culture en grand d'une autre bactérie.

Quoi qu'il en soit, on ne saurait trop insister sur les avantages de la méthode de Nicolle-Alilaire ; il n'en est pas d'autre, en effet, qui m'aurait permis de récolter en moins de 24 heures *trente-trois grammes* de corps microbiens n'ayant pour toute humidité que leur eau de constitution. Il va sans dire, d'ailleurs, que j'aurais pu recueillir, dans le même temps, une quantité de microbes beaucoup plus considérable si j'avais possédé un plus grand nombre de boîtes.

Dans toutes mes expériences j'ai récolté les corps microbiens après 18 à 20 heures de culture à 37° ; j'y ai plusieurs fois dosé l'humidité et j'ai toujours trouvé, à quelques décigrammes près, une teneur en eau de 80 0/0, très voisine par conséquent du chiffre donné par MM. Nicolle et Alilaire pour le *Proteus vulgaris*.

Les essais suivants ont tous été exécutés avec des corps microbiens desséchés représentant par conséquent cinq fois leur poids de bacilles frais, mais j'exprimerai tous les résultats en milligrammes de microbes humides. J'ai toujours injecté ceux-ci à l'état de suspension dans l'eau physiologique, à une dilution telle que 1 cc. correspondait à 20 milligrammes de microbes secs, c'est-à-dire à 100 milligrammes de microbes frais. Je préparais cette émulsion 48 heures à l'avance et je la traitais par l'éther de la même façon que les cultures totales, afin de me trouver dans des conditions analogues à celles de mes premières expériences et d'assurer pratiquement la stérilité de la dilution microbienne (1).

1° *Toxicité des corps microbiens desséchés à* 37° (*Proteus Tx*).

Les bacilles utilisés pour cette détermination avaient été obtenus en étendant en couche mince sur des plaques de verre stériles les corps microbiens d'une culture de 20 heures et en les abandonnant à eux-mêmes à 37° jusqu'à dessication. Bien entendu, cette opération avait été conduite de manière à éviter autant que possible toute contamination.

Cobaye (Poids moyen : 500 gr.).

Voie intra-péritonéale. — Dose mortelle : 100 milligrammes de corps bacillaires humides. Mort en moins de 18 heures ; exsudat péritonéal stérile.

Voie intra-veineuse. — Dose mortelle : 50 milligrammes ; mort en 20 heures.

2° *Toxicité des corps microbiens légèrement autolysés et desséchés dans le vide.*

Pour cette expérience les bacilles humides ont été abandonnés à

5. Pour les injections dans le péritoine j'injectais cette émulsion telle quelle, mais pour les injections intraveineuses la dose employée était diluée dans l'eau physiologique de manière à toujours injecter 3 cc. de liquide.

eux-mêmes à la température du laboratoire pendant 48 heures, puis desséchés rapidement dans le vide sur l'acide sulfurique.

Cobaye (Poids moyen : 500 gr.).

Voie intra-péritonéale. — Dose mortelle : 300 milligrammes b. humides ; mort en 18 heures.

Voie intra-veineuse. — Dose mortelle : 50 milligrammes ; mort en 15 heures.

3° *Toxicité des corps microbiens plasmolysés par le chlorure de calcium.*

Cet essai portait sur un produit obtenu en mélangeant la récolte de 2 cuvettes avec son poids de chlorure de calcium cristallisé, préalablement stérilisé. La bouillie résultant de cette opération avait été abandonnée à elle-même 24 heures à la température du laboratoire, puis dialysée en sac de collodion sur eau distillée stérile jusqu'à presque complète élimination des chlorures. Le contenu des dialyseurs avait alors été évaporé dans le vide, sur l'acide sulfurique, à la température ordinaire ; ce sont les bacilles ainsi plasmolysés et desséchés que j'ai utilisés.

Cobaye (Poids moyen : 500 gr.).

Voie intra-péritonéale. — Dose mortelle : 50 milligrammes b. humides ; mort en moins de 18 heures.

Voie intra-veineuse. — Dose mortelle : 50 milligrammes ; mort en 19 heures.

4° *Toxicité des corps microbiens tués par l'acétone.*

J'ai employé pour cette expérience des corps microbiens résultant du traitement de 30 grammes de bacilles frais par 600 cc. d'acétone. Après contact de quatre heures j'avais essoré les microbes sur un entonnoir de Büchner garni d'une rondelle de papier durci, je les avais desséchés à 40°, puis dans le vide à la température ordinaire.

Cobaye (Poids moyen : 500 grammes).

Voie intra-péritonéale. — Dose mortelle : 100 milligrammes b. humides ; mort en 24 heures.

Voie intra-veineuse. — Dose mortelle : 10 milligrammes ; mort en 20 heures.

5° *Toxicité des corps microbiens tués par l'alcool.*

Corps bacillaires préparés de la même façon que dans l'expérience précédente, mais en employant de l'alcool absolu.

Cobaye (Poids moyen : 500 gr.).

Voie intra-péritonéale. — Dose mortelle : 150 milligrammes bacilles humides ; mort en moins de 18 heures.

Voie intra-veineuse. — Dose mortelle : 25 milligrammes ; mort en 20 heures.

6° *Toxicité des corps microbiens épuisés par une solution faible de carbonate de sodium.*

J'ai délayé 30 gr. de microbes humides dans 500 cc. d'une solution stérile, à 5 pour 1.000, de CO^3Na^2 pur ; j'ai laissé en contact pendant trois heures puis j'ai centrifugé. J'ai repris les microbes ainsi traités par le même volume de solution alcaline et j'ai répété encore deux fois la première opération. Après la dernière centrifugation j'ai desséché dans le vide sur l'acide sulfurique les corps microbiens épuisés, ce sont eux que j'ai employés pour cette expérience.

D'autre part, j'ai rassemblé les deux litres de solution alcaline ayant servi à l'épuisement et, après filtration sur bougie Berkefeld, j'y ai ajouté peu à peu de l'acide acétique jusqu'à réaction très faiblement acide. Il s'est séparé un très faible précipité albuminoïdique que j'ai recueilli et desséché dans le vide ; il pesait alors cinq centigrammes, à quelques milligrammes près.

Cobaye (poids moyen : 500 gr.).

Voie intra-péritonéale. — Dose mortelle : 25 milligrammes b. humides ; mort en moins de 18 heures.

Voie intra-veineuse. — Dose mortelle : 25 milligrammes ; mort en 15 heures.

J'ai également recherché si la substance protéique extraite par les alcalis avait des propriétés toxiques ; pour cela je l'ai mise en suspension dans l'eau physiologique, stérilisée comme de coutume par l'éther et éprouvée sous la peau et dans le péritoine du cobaye. Les résultats ont été les suivants :

Voie sous-cutanée. — A la dose de 6 milligrammes de substance sèche pas de réaction générale ; localement : après 48 heu-

res gros noyau induré, au bout de quatre jours escarre brunâtre de la grandeur d'une pièce de 50 centimes avec induration très marquée des tissus voisins. Au cinquième jour chute de l'escarre ; dès le sixième la plaie commençait à se cicatriser, pas de suppuration. Au neuvième jour cicatrisation complète.

Voie intra-péritonéale. — A la dose de 12 milligrammes de substance sèche mort de l'animal (410 gr.) en moins de 18 heures ; péritonite, exsudat louche très abondant mais stérile.

7° *Toxicité des corps microbiens épuisés par l'alcool, l'acétone, l'éther et le chloroforme.*

J'ai tué des bacilles humides par l'alcool comme dans l'expérience n° 5, mais au lieu de les dessécher, je les ai épuisés par ce dissolvant dans l'appareil de Soxhlet pendant 8 heures ; puis j'ai continué l'épuisement successivement avec l'éther, l'acétone et le chloroforme. L'action de chacun de ces solvants fut prolongée pendant huit heures ; finalement j'ai chassé le chloroforme par chauffage à 50° sous pression réduite.

Pour 30 grammes de bacilles humides le poids des produits d'extraction obtenus par évaporation des dissolvants était de :

Extrait alcoolique	0,75
Extrait acétonique	0,10
Extrait étheré.	0,02
Extrait chloroformique.	0,05

J'ai injecté dans le péritoine de quatre gros cobayes 150 et 300 milligrammes de l'extrait alcoolique ainsi que 20 et 40 milligrammes de l'extrait acétonique en suspension dans 1 ou 2 cc. d'eau physiologique ; aucun des animaux n'a succombé. Je n'ai pas expérimenté les extraits éthéré et chloroformique à cause de leur insolubilité dans l'eau.

Quant aux corps microbiens épuisés ils m'ont donné les résultats suivants :

Cobaye (Poids moyen : 500 gr.).

Voie intra-péritonéale. — Dose mortelle : 150 milligrammes de b. humides ; mort en 18 à 24 heures.

Voie intra-veineuse. — Dose mortelle : 10 milligrammes ; mort en 20 heures.

Comme on le voit par ces diverses expériences, les corps microbiens du *Proteus* que j'ai étudié possèdent une toxicité propre assez élevée, particulièrement lorsqu'ils ont été traités par l'alcool, l'acétone ou une solution faiblement alcaline (1).

1. La toxicité des corps microbiens tués se manifestait également bien chez le lapin ; en effet, 300 milligrammes de bacilles humides (traités par l'acétone) suffisaient pour tuer en moins de 18 heures un animal de 2.500 grammes injecté dans le péritoine. Par voie intra-veineuse 25 milligrammes ont tué en 20 heures un lapin de 2.535 grammes.

CHAPITRE III

AUTOLYSATS ET ENDOTOXINE. — LÉSIONS PRODUITES PAR LES POISONS DU PROTEUS

A. — Toxicité des autolysats.

J'ai d'abord essayé un autolysat préparé en abandonnant pendant un mois à la température du laboratoire 2 grammes de bacilles humides délayés dans 20 cc. d'eau physiologique. Avant de l'injecter aux animaux, pour me placer dans les mêmes conditions que dans tous les essais précédents, je l'ai traité par l'éther comme mes cultures totales ; je l'ai alors éprouvé chez le cobaye et le lapin :

Cobaye (Poids moyen : 500 gr.).

Voie intra-péritonéale et voie intra-veineuse. — Dose mortelle : 1/4 de cc. correspondant à 25 milligrammes de bacilles humides ; mort en moins de 18 heures.

Lapin.

Voie intra-péritonéale. — 300 milligrammes de bacilles humides, soit 3 cc. d'autolysat, étaient nécessaires pour tuer en moins de 18 heures un lapin de 2 kilogrammes.

Voie intra-veineuse. — Il suffisait de 100 milligrammes de bacilles, soit 1 cc. d'autolysat pour déterminer la mort d'un lapin de 2.480 grammes en huit heures.

Après avoir ainsi déterminé la toxicité de l'autolysat total, j'ai centrifugé ce qui m'en restait et j'ai éprouvé chez le cobaye et le lapin le liquide clair obtenu :

Cobaye (Poids moyen : 500 gr.).

Voie intra-péritonéale. — Les doses correspondant à 25 et 50 milligrammes de bacilles frais étaient sans effet apparent.

Voie intra-veineuse. — Dose mortelle : 5 gouttes de liquide cor-

respondant environ à 25 milligrammes de bacilles humides ; mort de l'animal en 15 heures.

Lapin. — Par voie intra-veineuse une dose de liquide correspondant à 100 milligrammes a suffi pour tuer en 18 heures un animal de 2.515 grammes.

La toxicité de l'autolysat centrifugé était donc, pour la voie intra-veineuse, à peu près identique à celle de l'autolysat total.

J'ai fait alors une seconde expérience à l'aide d'un autolysat obtenu dans les conditions suivantes : Des bacilles humides ont été délayés dans trois fois leur poids d'eau physiologique ; après addition de la dose habituelle d'éther le mélange, placé dans un vase hermétiquement clos, a été abandonné à lui-même pendant six mois, à la température du laboratoire et à l'abri de la lumière. Au bout de ce temps l'éther a été chassé comme pour les cultures totales.

Cet autolysat dont un gramme représentait 0 gr. 25 de bacilles humides a été essayé après dilution dans l'eau physiologique de manière à l'amener à une concentration voisine de celle du précédent essai.

Cobaye (Poids moyen : 500 gr.).

Voie intra-péritonéale. — La dose mortelle correspondait à 125 milligrammes de bacilles humides ; la mort survenait en moins de 18 heures.

Voie intra-veineuse. — La dose mortelle équivalait à 60 milligrammes de bacilles ; mort en 19 heures.

Cet autolysat vieux de six mois et obtenu en présence d'éther était donc notablement moins toxique que le précédent, qui d'ailleurs était déjà beaucoup moins actif pour une même dose de bacilles, qu'une simple émulsion de corps microbiens modifiés par l'alcool, l'acétone ou un carbonate alcalin. Du reste l'expérience n° 2 des essais faits avec les corps bactériens montrait déjà un affaiblissement de la toxicité pour une simple autolyse de 48 heures sans addition d'eau.

B. — **Endotoxine du « Proteus Tx ».**

J'ai appliqué au *Proteus Tx* le procédé que Besredka (1) a

1. Besredka, « Des endotoxines solubles », *Ann. de l'Inst. Pasteur*, t. XXV, avril 1906, p. 304.

imaginé et qu'il a utilisé avec succès pour les bacilles de la peste, de la fièvre typhoïde et de la dysenterie.

J'ai délayé 5 grammes de bacilles humides (Gélose Nicolle) dans 20 cc. d'eau physiologique. J'ai chauffé cette dilution à 60° pendant une heure, après quoi je l'ai versée en couche mince dans des boîtes de Pétri et desséchée dans le vide sur l'acide sulfurique. J'ai recueilli les bacilles secs et j'en ai trituré 1 gramme au mortier d'agate, dans les conditions indiquées par l'auteur, avec 0,45 de NaCl et 2 cc. d'eau ; avec de l'eau distillée j'ai complété au volume de 50 cc. et j'ai laissé l'émulsion reposer vingt-quatre heures. Je l'ai alors chauffée une heure et demie à 56°, puis centrifugée.

J'ai essayé sur des cobayes le liquide clair résultant de cette opération et j'ai pu leur en injecter jusqu'à 8 cc. dans le péritoine sans provoquer la mort ; cependant avec les doses supérieures à 6 cc. les animaux étaient malades. Durant quelques heures ils restaient somnolents dans un coin de leur cage, se mettaient en boule et avaient le poil hérissé ; mais le lendemain ils étaient complètement rétablis.

Comme ces premiers résultats étaient médiocres et que je n'avais plus de solution toxique, avant d'en préparer d'autre j'ai voulu rechercher s'il n'était pas possible d'obtenir l'endotoxine par une autre méthode. Pour cela j'ai délayé peu à peu, dans un mortier de Joulie, des corps microbiens humides (gélose Nicolle) dans trois fois leur poids de glycérine pure à 30° ; j'ai laissé la glycérine agir pendant une heure à la température du laboratoire puis j'ai additionné le mélange de dix volumes d'alcool absolu. J'ai laissé se déposer le précipité de corps microbiens, puis j'ai siphonné la liqueur alcoolique surnageante. J'ai repris les microbes par le même volume d'alcool et répété encore deux fois cette opération, j'ai fait dans les mêmes conditions un lavage à l'alcool-éther et j'ai terminé par un lavage à l'éther à 66°.

J'ai essoré les corps bacillaires sur un entonnoir de Büchner, puis je les ai laissés 24 heures à 37° et 24 heures dans le vide, sur l'acide sulfurique, à la température ordinaire. J'ai déterminé leur toxicité massive qui était exprimée par les chiffres suivants :

Cobaye (Poids moyen : 500 grammes).

Voie intra-péritonéale. — Dose mortelle : 150 milligrammes de bacilles humides.

Voie intra-veineuse. — Dose mortelle : 50 milligrammes.

Dans les deux cas mort en plus de 6 heures et moins de 18. Pour extraire l'endotoxine j'ai mis en suspension 1 gramme de microbes secs ainsi plasmolysés par la glycérine dans 50 cc. d'eau physiologique et j'ai laissé en contact, à la température du laboratoire, pendant 24 heures ; au bout de ce temps j'ai centrifugé longuement à l'aide d'une centrifugeuse de Jouan pour séparer complètement les corps bacillaires. J'ai obtenu ainsi un liquide parfaitement clair légèrement jaunâtre que j'ai éprouvé sur de petits cobayes d'un poids moyen de 300 grammes.

Par *voie intra-péritonéale* la dose mortelle était de 4 cc., volume de solution contenant l'endotoxine de 80 milligrammes de microbes secs, c'est-à-dire 400 milligrammes de bacilles humides.

Par *voie intra-veineuse* la dose mortelle était de 2 cc. contenant l'endotoxine de 200 milligrammes de bacilles humides.

Les animaux injectés dans le péritoine présentaient d'abord au bout de 5 à 6 heures les mêmes symptômes qu'avec la solution obtenue par la méthode de Besredka, mais vers la huitième heure ils tombaient sur le flanc, le train postérieur paralysé et mouraient vers la vingtième heure ; les cobayes injectés dans les veines présentaient des symptômes analogues, mais la mort survenait beaucoup plus vite, au bout de neuf heures.

J'ai arrêté là mes essais, mais ils sont suffisants pour montrer que l'on peut, par le procédé que je viens d'indiquer (1), extraire une endotoxine des corps microbiens jeunes du *Proteus vulgaris* ; cette substance ne semble d'ailleurs être qu'un facteur de toxicité peu important pour la race que j'ai examinée.

C. — Poison de Vaughan du « Proteus Tx »

Il y a longtemps déjà que Vaughan (2) a montré que par l'hydrolyse alcaline en milieu alcoolique on peut extraire des corps microbiens une substance très toxique de nature albumosique qui paraît être la même pour les nombreuses espèces microbiennes qu'il a étudiées. Cette substance soluble dans l'alcool et dans l'eau

1. J'ai déjà eu l'occasion d'observer que ce procédé se prête bien à l'extraction de diverses diastases endocellulaires de certains microbes ; je continue d'ailleurs à étudier cette question.

2. Vaughan, « A study of Bacterial Cells », *Trans. Ass. of Amer. Phys.* 1902, pp. 242-331.

est un poison du centre respiratoire qui agit sans incubation, elle manifeste son action par les voies sous-cutanée, intra-péritonéale et intra-veineuse, mais elle est inoffensive par ingestion.

J'ai cherché à l'extraire du *Proteus Tx*, en suivant la technique si bien précisée par S M. Wheeler (1) et qui est la suivante :

Les microbes rigoureusement secs sont délayés dans 15 à 25 fois leur poids d'alcool *absolu* contenant 2 pour 100 de NaOH ; le mélange placé dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant est mis au bain-marie. L'alcool est porté à l'ébullition et maintenu dans cet état pendant une heure. Au bout de ce temps la solution alcoolique est séparée et le résidu traité à nouveau par l'alcool sodique ; après séparation de cette deuxième liqueur alcoolique on fait encore une extraction dans les mêmes conditions. On réunit les solutions alcooliques des trois opérations et l'on filtre rapidement sur papier.

Le filtrat contenant le poison dissous est neutralisé avec une quantité calculée d'acide chlorhydrique concentré ; on filtre pour séparer le chlorure de sodium formé et on distille dans le vide à 40° la liqueur claire obtenue.

Le résidu de la distillation parfaitement desséché dans le vide, sur l'acide sulfurique, est repris par l'alcool absolu bouillant pour débarrasser le poison de Vaughan de ce qu'il contient encore de chlorure de sodium. On filtre et l'on concentre dans le vide à 40° cette solution purifiée ; on verse le résidu de cette distillation dans un récipient largement ouvert et on achève la dessication dans le vide sur l'acide sulfurique à la température du laboratoire.

Si l'on a employé de l'alcool bien absolu et des corps microbiens parfaitement exempts d'eau, le poison de Vaughan forme au fond du vase d'évaporation une croûte friable qui se détache facilement et que l'on peut aisément pulvériser. Bien entendu la poudre obtenue doit être conservée à l'abri de l'humidité.

En traitant de cette façon 10 grammes de corps microbiens, j'ai eu finalement 1 gr. 35 d'une poudre jaune entièrement soluble dans l'alcool absolu bouillant et dans l'eau. J'en ai fait une solution dans l'eau physiologique, à une concentration telle que 1 cc. correspondait à 20 milligrammes ; j'ai déterminé la toxicité de cette liqueur en injectant des doses croissantes dans la jugulaire de très gros cobayes d'un poids moyen de *700 grammes*. Il m'a

1. Sybil May Wheeler, « A study of the chemistry of bacterial cellular proteins », *Journal of Biological Chemistry*, t. VI, 1909, p. 508.

fallu atteindre la dose de 45 milligrammes pour obtenir la mort immédiate des animaux — en 3 à 4 minutes — avec la dyspnée violente si caractéristique.

La toxicité du poison de Vaughan que j'ai extrait du *Proteus Tx* est donc *relativement* faible puisque la dose mortelle établie par M. Nicolle et G. Abt (1) pour le *B. coli* était seulement de 3 milligrammes.

D. — Lésions produites par les poisons du « Proteus »

Pour terminer cette étude sommaire des facteurs de toxicité du *Proteus Tx*, je vais exposer brièvement ce que j'ai eu l'occasion d'observer à l'autopsie des cobayes ayant succombé à l'injection des solutions ou émulsions les plus toxiques que j'ai utilisées dans mes diverses expériences. Je décrirai ensuite les lésions locales consécutives à l'injection sous-cutanée de doses incapables d'altérer l'état général des animaux.

a) *Lésions viscérales.*

1° *Corps microbiens traités par l'acétone.* — Injection intra-péritonéale de 40 milligrammes de microbes secs (200 b. humides) ; cobaye de 475 grammes. — Mort en 17 heures ; autopsie 4 heures après :

Congestion intense du péritoine ; exsudat péritonéal louche, très abondant et aseptique. Reins pâles ; surrénales très congestionnées ; exsudat blanchâtre à la surface de la rate et à la face postérieure du foie. Intestin grêle très hyperémié et distendu par un liquide jaunâtre et filant ; fausses-membranes peu épaisses à la face postérieure de l'estomac. Poumons normaux, cœur distendu.

2° *Corps microbiens traités par* CO^3Na^2. — Injection intra-péritonéale de 10 milligrammes microbes secs (50 b. humides) ; cobaye de 490 grammes. Mort en 7 heures, autopsie immédiate :

Intestin grêle et péritoine pâles ; exsudat péritonéal rosé, abondant et aseptique. Fausses-membranes épaisses à la face postérieure de l'estomac. Foie pâle et couvert d'un enduit crémeux ;

1. M. Nicolle et Abt. « Les anticorps des albuminoïdes et des cellules », *Ann. de l'Inst. Pasteur*, t. XXII, 1908, p. 132.

reins normaux, surrénales un peu congestionnées. Poumons normaux ; cœur distendu.

3° *Autolysat d'un mois, dans l'eau physiologique.* — Injection intra-péritonéale de 1/2 cc., soit 50 milligrammes bacilles humides. Cobaye de 400 grammes. Mort en 9 heures, autopsie immédiate :

Exsudat péritonéal rosé, louche, stérile. Enduit crémeux sur le foie, la rate et les reins. Congestion violente des surrénales ; péritoine et intestin grêle légèrement hyperémiés. Rate et foie gros, gorgés de sang ; poumons et cœur distendus.

4° *Corps microbiens plasmolysés par la glycérine et traités par l'alcool.* — Injection intra-péritonéale de 60 milligrammes microbes secs (300 b. humides). Cobaye de 410 grammes ; mort en 24 heures, autopsie deux heures après :

Péritoine, intestin et estomac très congestionnés. Abondant exsudat péritonéal limpide à peine jaunâtre, stérile. Reins et rate pâles ; surrénales extrêmement congestionnées. Foie normal, à part un peu d'enduit crémeux sur son bord antérieur. Cœur et poumons normaux

5° *Filtrat d'une culture sur peptone de caséine.* — Injection intraveineuse de 4 cc. Cobaye de 400 grammes ; mort en 8 heures et demie ; autopsie immédiate :

Foie et intestin très congestionnés. Péritoine et surrénales hyperémiés. Reins pâles. Exsudat péritonéal limpide et abondant. Rate, cœur et poumons normaux.

b) *Lésions locales.*

1° *Culture de 48 heures en bouillon Martin, stérilisée par l'éther.* — Injection sous-cutanée de 1 cc. à un cobaye de 500 grammes environ :

Après 24 heures au point d'inoculation, empâtement. Après 48 heures induration ; puis formation d'une escarre qui était encore adhérente au sixième jour, mais qui s'est éliminée le septième en laissant une plaie bourgeonnante, complètement cicatrisée au 15e jour.

2° *Corps microbiens traités par l'acétone.* — Injection sous-cutanée de 20 milligrammes, soit 100 milligrammes de b. humides. Cobaye d'environ 500 grammes. Après 24 heures au point d'inoculation, gros noyau induré. Même évolution que dans l'expérience

précédente, mais escarre plus grande et s'éliminant dès le cinquième jour en laissant une plaie anfractueuse, suppurante qui n'a été complètement cicatrisée qu'au bout de 25 jours.

3° *Autolysat d'un mois, en présence d'eau physiologique.* — Injection sous-cutanée de 1/2 cc. correspondant à 50 milligrammes de bacilles humides. Cobaye d'environ 500 grammes.

Même évolution qu'avec les corps microbiens jusqu'à la chute de l'escarre qui a le diamètre d'une pièce de cinq francs (6e jour). Grande plaie anfractueuse suppurant abondamment sans aucune tendance à la cicatrisation. L'animal est mort cachectique au 17e jour.

CHAPITRE IV

ESSAIS D'IMMUNISATION CONTRE UN PROTEUS PROVENANT D'UN CAS DE DIARRHÉE INFANTILE

M. Cantù, ayant annoncé qu'il allait entreprendre des recherches d'ensemble sur la vaccination et la sérothérapie contre le *Proteus*, je me suis borné à rechercher s'il était facile d'immuniser les animaux avec une race isolée d'un cas grave de diarrhée infantile.

L'échantillon que j'ai utilisé pour toutes mes expériences avait été isolé par M. Metchnikoff des matières fécales d'un nourrisson mortellement atteint d'une gastro-entérite aiguë. Sa virulence et sa toxicité étaient assez grandes, ainsi que le montrent les chiffres suivants :

1° Culture de 7 jours en bouillon Martin, *vivante* : 1/2 cc. en injection intra-péritonéale tuait en 24 heures un cobaye de 500 grammes (avec une culture de 24 heures il fallait 2 cc.).

2° Culture de 7 jours en bouillon Martin, *stérilisée* par l'éther : la mort du cobaye de 500 grammes survenait en 24 à 30 heures à la suite d'une injection de 2 cc. dans le péritoine. L'injection intraveineuse de 1 cc. tuait les animaux en moins de 18 heures.

3° Corps microbiens vivants âgés de 24 heures : 3 milligrammes de bacilles humides injectés dans le péritoine, déterminaient en 24 heures la mort de cobayes d'environ 500 grammes.

Pour tuer en 24 heures des lapins d'environ 2.000 grammes, il suffisait de leur injecter, dans le péritoine, 2 cc. d'une culture en bouillon Martin, vieille de 7 jours, ou 10 milligrammes de corps microbiens jeunes.

J'ai d'abord essayé d'immuniser des lapins en leur injectant dans les veines des microbes vivants bien lavés et mis en suspen-

sion dans un très grand volume d'eau, comme le recommande M. Ch. Nicolle (1).

1re *expérience.* — *Proteus M*, culture de 24 heures sur gélose ordinaire (tube de 170 mm. × 17 mm.), totalité de la culture délayée dans l'eau physiologique, centrifugée, lavée trois fois et amenée au volume de 10 cc.

Lapin de 2.700 grammes. Injecté très lentement dans les veines :

		d'émulsion au 1/10 (dilué dans 10 cc. eau physiologique)			
1er jour :	1/4 goutte				
6e jour :	1 goutte	—	—	—	—
11e jour :	2 gouttes	—	—	—	—
16e jour :	4 gouttes	—	—	—	—
21e jour :	6 gouttes	—	—	—	—
26e jour :	8 gouttes	—	—	—	—
31e jour :	10 gouttes	—	—	—	—

Le 36e jour l'animal fut éprouvé par injection intra-péritonéale de 2 cc. d'une culture de 7 jours en bouillon Martin du même *Proteus M* ; il succomba au troisième jour. Un témoin du poids de 2.620 grammes était mort en 24 heures.

2e *expérience.* — *Proteus M*, culture de 24 heures sur gélose ordinaire (tube de 170 mm. × 17 mm.). Totalité de la culture délayée dans l'eau physiologique, centrifugée, lavée trois fois et amenée au volume de 10 cc.

Deux lapins : 2.680 et 2.450 grammes. A chacun d'eux injecté *très lentement* dans les veines :

		d'émulsion au 1/10 (diluée dans 10 cc. eau physiologique)			
1er jour :	1 goutte				
6e jour :	2 gouttes	—	—	—	—
11e jour :	4 gouttes	—	—	—	—
16e jour :	6 gouttes	—	—	—	—
21e jour :	8 gouttes	—	—	—	—
26e jour :	10 gouttes	—	—	—	—
31e jour :	15 gouttes	—	—	—	—

1. Ch Nicolle, A. Conor et E. Conseil, « Sur l'injection intraveineuse du vibrion cholérique vivant », *C. R. de l'Acad. des Sciences*, 24 juin 1912, p. 1823.

Le 36e jour les deux animaux furent éprouvés par injection intra-péritonéale de 2 cc. d'une culture de 7 jours en bouillon Martin ; tous les deux résistèrent. Ils étaient encore vivants et bien portants, 15 jours après l'inoculation d'épreuve, alors qu'un témoin de 2.530 grammes était mort en 24 heures.

Ayant ainsi immunisé des lapins par voie intraveineuse, j'ai essayé, en collaboration avec mon collègue et ami M. D. M. Bertrand, de vacciner des cobayes par voie sous-cutanée. Nous avons employé le même *Proteus M* ; nos vaccins, préparés avec des corps microbiens jeunes correspondaient tous à la dilution d'une culture de 24 heures sur gélose ordinaire (tube de 170 mm × 17 mm.) dans 10 cc. d'eau physiologique.

Dans une même expérience nous avons essayé les sept émulsions suivantes :

I. *Bacilles vivants sensibilisés* suivant la technique de Besredka avec le sérum des deux lapins immunisés par les injections intraveineuses. Nous avons vérifié par l'épreuve du péritoine, faite d'après les indications de Dopter (1), que ce sérum très agglutinant était aussi antimicrobien.

II. *Bacilles stérilisés par l'éther* suivant la technique de Vincent.

III. *Bacilles stérilisés par le chlorure d'éthyle* (2).

IV. *Bacilles stérilisés par la chaleur*, une heure à 56°.

1. Ch. Dopter, Sérothérapie antiméningococcique dans *Médicaments microbiens* de la Bibliothèque de thérapeutique Gilbert et Carnot, 2e édition, p. 308.

2. Les propriétés qui font du chlorure d'éthyle un excellent anesthésique général, en font également un très bon agent de stérilisation des cultures Je ne sais s'il vaut le rayonnement ultra-violet, mais il est vraisemblable qu'il doit encore moins modifier la constitution des corps microbiens que l'éther, qui présente déjà à cet égard certains avantages ; je l'ai utilisé pour préparer quelques vaccins que je ne pouvais sensibiliser, ou que je ne voulais pas injecter vivants, ni traiter par la chaleur, et j'ai été satisfait des résultats qu'il m'a donnés.

Pour stériliser par le chlorure d'éthyle une émulsion microbienne, on abaisse la température de celle-ci au voisinage de 0° en plaçant le tube qui la renferme dans la glace concassée, puis on y introduit, par 10 cc. d'émulsion, un ou deux centimètres cubes de chlorure d'éthyle liquide en se servant pour cela du jet capillaire produit par les petits tubes qu'on utilise pour l'anesthésie locale. On agite doucement le mélange des deux liquides et l'on place le tube dans une éprouvette de Dewar, plus profonde qu'il n'est haut ; on l'y laisse 24-48 heures. Pour se débarrasser rapidement du chlorure d'éthyle, il suffit de plonger quelque temps dans un bain d'eau tiède le tube qui contient l'émulsion stérilisée.

V. *Bacilles stérilisés par l'alcool à 50°* ; contact de 24 heures.

VI. *Bacilles traités par le bleu de méthylène* ; contact de 24 heures, solution aqueuse à 1 0/0, bleu médicinal Höchst. Bacilles vivants.

VII. *Bacilles traités par l'iode.* Action prolongée 24 heures de la solution : Eau 100 ; KI 0,2 ; I 0,1.

Dans toutes ces préparations les bacilles avaient été lavés deux fois par centrifugation en présence d'eau physiologique.

Nous avons injecté 1 cc. de chacun de ces vaccins sous la peau de deux cobayes de 4 à 500 grammes ; sept jours après nous avons fait une nouvelle injection de 1 cc. 5, enfin après un nouveau repos de sept jours nous avons encore injecté 2 cc.

Indépendamment de ces quatorze cobayes nous en avons traité trois par des injections sous-cutanées de bacilles vivants non modifiés ; mais, si la première injection de 1 cc. ne leur avait causé qu'un empâtement dur assez volumineux, la seconde de 1 cc 5, a provoqué la formation de lésions suppurées qui nous ont empêché de pratiquer la troisième. D'ailleurs au bout de cinq semaines les trois témoins étaient morts, l'un de pneumonie, les deux autres cachectiques.

Voici maintenant ce que nous avons observé avec les divers vaccins : Après la 1re injection les animaux qui avaient été traités par I, II et III ont présenté pendant 2 ou 3 jours un petit nodule induré, les autres ont eu une réaction locale un peu plus intense avec une induration plus persistante sauf un des cobayes traité par IV. Après la seconde injection la réaction a été la même pour III, IV, V et VII, mais plus accusée pour les autres, particulièrement avec II ; enfin la troisième injection, de 2 cc., a causé un léger empâtement, disparu en 3 à 4 jours, avec I, V, VI et VII et la formation de noyaux indurés assez persistants avec tous les autres vaccins (depuis 7 et 9 jours pour III, jusqu'à 13 jours pour un des cobayes II).

Tous ces animaux ont été éprouvés, 8 jours après la dernière vaccination, par injection intra-péritonéale d'un centimètre cube d'une émulsion de jeunes bacilles, dose correspondant à environ trois milligrammes de microbes humides (*Proteus M*). Aucun de ces cobayes n'a succombé ; ils étaient tous en bon état huit jours après, alors que trois témoins de 425, 535 et 480 grammes, éprouvés dans les mêmes conditions, étaient morts au plus tard en 27 heures.

En résumé, nous n'avons pas éprouvé, M. D. M. Bertrand et moi, plus de difficulté à vacciner les cobayes par voie sous-cutanée contre le *Proteus M*, que je n'en avais eu à immuniser les lapins par la voie intra-veineuse.

CHAPITRE V

ACTION ANTI-INFECTIEUSE DE LA CHOLINE ET DE LA NEURINE

Dès 1889, Foà et Bonome (1) avaient montré qu'en injectant à des lapins de très petites doses d'un mélange de choline et de neurine, il était possible de les rendre réfractaires à l'infection par le *Proteus*. En 1890, Tito Carbone (2) confirma leurs observations, tout au moins pour la choline ; ses expériences lui ayant donné des résultats constants il se contenta d'en rapporter une seule dans des termes dont voici la traduction :

« Un lapin de 2.200 grammes a été injecté dans la jugulaire avec 10 cc. d'une solution de chlorhydrate de choline qui contenait par centimètre cube 6 milligrammes de ce sel ; dyspnée et flux salivaire. Le lendemain injection endopéritonéale de 3 cc. de la même solution. Le deuxième jour injection endopéritonéale de 2 cc. d'une culture de *Proteus* de 7 jours. La même quantité a été injectée à un lapin de contrôle. Celui-ci meurt après 24 heures, mais celui injecté avec de la choline survit. » « La constance avec laquelle ces expériences se répètent ne laisse aucun doute sur la possibilité d'immuniser les lapins contre le *Proteus vulgaris* en leur injectant de la choline dans le sang. Les injections des Professeurs Foà et Bonome étaient faites avec un mélange à parties égales de neurine et de choline, mais les quantités injectées étaient si minimes (4 dixièmes de milligrammes) que l'on peut difficilement attribuer la réaction immunisante à la dernière substance et non à la première ; on sait, en effet, que l'activité de la neurine est

1. Foa et Bonome, *Archives italiennes de Biologie*, 8 avril 1887, 16 déc. 1889, Acad de Médecine de Turin.

2. Tito Carbone, « Ueber die vom *Proteus vulgaris* erzeugten Gifte », *Centralbl. f. Bakteriologie*, 1890, t. VIII, Original, p. 768.

dix fois plus forte que celle de la choline. On sait aussi que ces deux substances ont des réactions communes et qu'elles forment avec la muscarine un groupe pharmacodynamique distinct. A cause de cela j'ai voulu voir si elles étaient aussi identiques par leur réaction immunisante contre le *Proteus* et, comme je n'avais pas de neurine pure, j'ai expérimenté avec la muscarine. » « A un lapin de 1.800 grammes on injecte sous la peau une très faible quantité de muscarine. Dyspnée violente, ralentissement du cœur, flux salivaire abondant, diarrhée. On répète cette injection le même jour avec les mêmes réactions. Au quatrième jour injection endopéritonéale de 2 cc. d'une culture de *Proteus* de 7 jours. L'animal survécut, mais l'animal de contrôle qui avait été injecté avec la même quantité de *Proteus* mourut après 24 heures. »

De ces expériences Tito Carbone avait conclu que l'on peut immuniser les animaux contre une bactérie en leur injectant préventivement les ptomaïnes produites par celle-ci ou même des substances de constitution analogue. Il est regrettable qu'il ait généralisé aussi vite et qu'il n'ait pas pris simplement en considération ce fait que la choline et la neurine sont capables d'empêcher l'évolution d'une infection, car il aurait certainement eu l'idée d'étendre ses recherches et il aurait pu établir que ces deux bases possèdent, vis-à-vis de nombreux virus, une action anti-infectieuse des plus nettes. On s'explique d'ailleurs facilement qu'en 1890, à une époque où l'on savait encore peu de choses sur les moyens de défendre l'organisme contre les microbes, l'attention de Carbone ait été absorbée toute entière par l'idée qu'il avait trouvé une méthode générale d'immunisation.

Presque tous les auteurs qui se sont occupés du *Proteus* citent le mémoire de Tito Carbone sur les poisons fournis par ce microbe, mais il n'en est guère qui se soient intéressés à ses expériences sur la choline. Je dois avouer que si je n'ai pas agi comme eux, c'est que, tout d'abord, les résultats obtenus par Carbone, aussi bien que par Foà et Bonome, me parurent si invraisemblables que je me refusai à les admettre sans les avoir contrôlés.

Dans ce but, je fis une expérience dont voici l'exposé : A un lapin de 2.350 grammes, j'injectai lentement dans la veine de l'oreille six centigrammes de chlorhydrate de choline (Poulenc) (1) dissous

1. Le chlorhydrate Poulenc et le bromhydrate et le chlorhydrate Hoffmann-La Roche avaient au point de vue qui m'occupe une action absolument identique.

dans 10 cc. d'eau physiologique ; l'animal présenta simplement une salivation abondante. A un lapin de 2.600 grammes j'injectai dans les mêmes conditions 7 dixièmes de milligrammes de bromhydrate de neurine (Hoffmann-La Roche) qui provoquèrent une légère salivation et une dyspnée assez intense qui persista pendant 20 minutes. Vingt-quatre heures après je fis à ces deux animaux, ainsi qu'à un témoin de 2.170 grammes, une injection intra-péritonéale de 2 cc. d'une culture de *Proteus* en bouillon Martin, vieille de 7 jours.

Le témoin mourut 48 heures après avec une violente péritonite tandis que les deux lapins traités par la choline et la neurine ne présentèrent aucun symptôme d'infection apparent. Quinze jours après l'inoculation d'épreuve ils étaient encore bien portants.

Le témoin n'étant mort qu'en 48 heures, je fis avec le *Proteus M* une nouvelle expérience dans les conditions suivantes :

J'injectai 6 centigrammes de chlorhydrate de choline dans les veines d'un lapin de 2.360 grammes et 7 dixièmes de milligrammes de bromhydrate de neurine à un lapin de 2.300 grammes ; le lendemain ces deux animaux reçurent une injection intra-péritonéale de 2 cc. d'une culture de *Proteus M*, en bouillon Martin, vieille de 7 jours. Ils résistèrent à cette épreuve et quinze jours après ils étaient en parfait état tandis que deux témoins de 2.360 et 2.480 grammes étaient morts en 24 heures.

Ces deux expériences réalisées dans des conditions plus défavorables que celles de Carbone, puisque j'avais omis la seconde injection de substance active, m'ont donc confirmé ce qu'avait observé cet auteur relativement à l'action protectrice de la choline contre l'infection par le *Proteus* : en me donnant également un résultat favorable avec la neurine elles m'ont prouvé qu'il avait bien interprété les recherches de Foà et Bonome.

Ne doutant plus des faits rapportés par ces divers auteurs j'ai étudié l'action de la choline dans quelques autres infections.

Pour tous mes essais je me suis servi d'une solution isotonique de chlorhydrate de choline dont la composition était la suivante :

Eau	100 gr.
Chlorhydrate de choline	1 gr.
Chlorure de sodium.	0 gr. 40

Un centimètre cube de cette solution contenait donc 1 centi-

gramme de chlorhydrate de choline. Voici l'exposé sommaire de quelques-unes de mes expériences :

1° Un cobaye de 430 grammes reçoit par la jugulaire 25 milligrammes de chlor. de choline, un autre de 470 grammes reçoit sous la peau 100 milligrammes du même sel. Vingt-quatre heures après on injecte dans le péritoine de ces deux animaux 1/2 cc. d'une culture en bouillon de *B. coli* ; puis on leur fait une injection sous-cutanée de 10 milligrammes de chlor. de choline, injection que l'on répète les jours suivants (jusqu'au dixième jour). Les deux cobayes ne paraissent ressentir aucun trouble à la suite de l'inoculation et quinze jours après ils sont toujours en parfait état, tandis qu'un témoin de 470 grammes, éprouvé en même temps, est mort en 48 heures d'une violente péritonite.

II. Expérience identique, mais inoculation d'épreuve avec 1/4 de centimètre cube d'une culture en bouillon de B. Pyocyanique. Cobaye de 435 et 510 grammes ; témoin de 525 grammes.

Les animaux traités par la choline étaient encore bien portants trois semaines après l'inoculation ; témoin mort le 7e jour.

III. Expérience identique à la précédente, mais épreuve avec 1 cc. de culture de B. Pyocyanique. Cobaye de 460 et 390 grammes ; témoin de 420 grammes. Le cobaye traité par injection veineuse de 25 milligrammes de chlor. de choline et une injection sous-cutanée de 10 milligrammes est mort 18 heures après l'épreuve, en même temps que le témoin, tandis que le cobaye de 390 grammes traité par voie sous-cutanée (100 milligrammes, puis 10 pendant 10 jours) n'a présenté qu'un peu d'amaigrissement, et il s'est parfaitement rétabli. Il était en parfait état trois semaines après l'épreuve.

IV. Expérience avec le Pneumobacille de Friedlander ; cobayes de 600, 610 et 570 grammes. Résultats identiques en tous points à ceux de l'expérience III.

Dans des essais de même genre faits sur la souris avec le B. Pyocyanique et le Pneumobacille j'ai constaté que la mort des animaux traités par une seule injection sous-cutanée de 10 milligrammes de choline survenait 2 à 3 jours plus tard que celle des témoins qui succombaient en 24 à 36 heures. Enfin dans quelques expériences préliminaires j'ai préservé des cobayes, contre l'infection péritonéale par le Coli, le Pyocyanique ou le Pneumobacille, en leur injectant sous la peau 10 milligrammes de bromhydrate de neurine avant l'inoculation puis 2 milligrammes les jours suivants.

En somme, il semble bien que la choline soit susceptible d'augmenter considérablement la résistance de l'organisme à divers virus.

Dans quelles conditions et dans quelles limites cette action anti-infectieuse (1) peut-elle se manifester ; quel en est le mécanisme et quelles applications thérapeutiques pourra-t-on en faire ? C'est ce que je m'efforcerai d'établir à la fois pour la choline, la neurine et les corps de constitution analogue.

Seul ou en collaboration j'ai donc continué à étudier expérimentalement l'action de la choline et de la neurine dans certaines infections (tuberculose, pneumococcie, streptococcie, etc...). J'ai aussi abordé l'étude de la réaction leucocytaire que ces bases déterminent et j'ai entrepris de les utiliser pour faciliter les vaccinations par les virus vivants ; enfin j'ai également commencé à rechercher si elles ne sont pas susceptibles d'empêcher ou d'atténuer l'évolution de certaines intoxications produites par des substances d'origine biologique, et j'ai déjà observé dans cet ordre d'idées quelques faits encourageants.

Enfin, s'il se confirme que la choline et la neurine sont vraiment capables, comme je le crois, de mettre l'organisme en état de mieux se défendre, il faudra vraisemblablement leur attribuer une part importante dans l'action thérapeutique de certains médicaments. MM. Desgrez et Ali Zaky (2) ont établi que l'influence de la lécithine sur divers phénomènes de la nutrition est due à la choline qui entre dans la constitution de sa molécule ; il est donc probable que son action favorable sur la leucocytose et au cours de la tuberculose expérimentale dépend de la même cause. Il est bien possible également que les bases choliniques qui existent dans certains extraits autolytiques de levure en constituent les éléments les plus actifs.

1. Cette action anti-infectieuse me paraît tout à fait indépendante de l'action bactéricide que possèdent également la choline et la neurine libres, car celle-ci se manifeste dans des conditions qui ne peuvent guère se trouver réalisées dans l'organisme.

2. Desgrez et Ali Zaky. « Analyse du mode d'action des lécithines sur l'organisme animal », *C. R de l'Acad. d. Sciences*. 23 juin 1902, p. 1523.

TROISIÈME PARTIE

Recherches sur l'action pathogène d'une association microbienne : « Proteus vulgaris » et « Bacillus aminophilus intestinalis ».

Si l'on veut que les recherches sur la flore intestinale, comme facteur d'infection ou d'autointoxication, aient quelques chances d'aboutir à un résultat utile, il est indispensable d'avoir sans cesse présente à l'esprit l'extrême diversité des espèces qui la constituent. On évite ainsi de s'attarder trop longtemps à l'étude individuelle de celles-ci et l'on est amené au contraire à examiner avec soin les nombreuses symbioses qu'elles permettent de réaliser.

De plus, dans l'étude même de ces associations microbiennes au point de vue de leur action pathogène il ne faut pas seulement considérer les propriétés toxiques des cultures symbiotiques obtenues *in vitro* et il est nécessaire de déterminer quels sont les effets produits chez l'animal par l'ensemencement massif du tube digestif avec les microbes considérés. Mieux encore ces effets doivent être étudiés sur des animaux soumis à une alimentation convenablement choisie, d'après les propriétés biochimiques particulières aux espèces qui composent l'association bactérienne utilisée.

Pour montrer la nécessité d'une telle méthode dans l'étude de la flore intestinale, je pourrais m'appuyer sur des considérations théoriques se prêtant à de longs développements, mais comme à cet égard rien ne vaut les faits je préfère m'en tenir au simple exposé de ce que j'ai eu l'occasion d'observer en étudiant la symbiose du *Proteus vulgaris* et du *Bacillus aminophilus intestinalis*.

Tout d'abord je dois rappeler, qu'en collaboration avec M. D. M. Bertrand (1), nous avons isolé cette dernière bactérie, des matières fécales acides d'un sujet atteint de troubles intestinaux persistants. Pour cet isolement nous avions employé la méthode générale que j'ai préconisée (2) pour séparer facilement certaines espèces de la flore intestinale, que j'ai qualifiés d'acidaminolytiques, parce qu'elles présentent une affinité spéciale à l'égard des acides aminés.

En étudiant ce microbe nous avons constaté qu'il appartient au même groupe que le Pneumobacille et le *B. lactis aerogenes* ; il est très voisin de ce dernier, possède à peu près les mêmes propriétés saccharolytiques et acidogènes, mais il s'en distingue par quelques points de sa morphologie, l'agglutination et surtout l'énergie avec laquelle il attaque les aminoïques, aux dépens desquels il donne, suivant les aliments qui sont à sa disposition, des produits très variés parmi lesquels se trouvent notamment des amines toxiques.

Le *B. aminophilus intestinalis* est en somme un microbe voisin du *B. lactis aerogenes* capable de produire dans l'intestin soit d'assez grandes quantités d'acides où domine l'acide lactique, soit une proportion notable de ptomaïnes dont certaines, comme l'imidazoléthylamine, présentent une très grande toxicité. Cette production d'acide lactique et d'amines nocives peut d'ailleurs être simultanée ; dès le début de nos recherches nous avons vu que le *B. aminophilus* peut donner de l'imidazoléthylamine dans un milieu à base d'histidine non sucré et contenant une faible proportion d'acide lactique (3), mais depuis que nous avons publié ce fait nous avons isolé une race du même microbe qui peut, dans une

1. Albert Berthelot et D. M. Bertrand, « Recherches sur la flore intestinale. Isolement d'un microbe capable de produire de l'imidazoléthylamine aux dépens de l'histidine », *C. R. de l'Acad. des Sciences,* 10 juin 1912, t. CLIV, p. 1643.

Albert Berthelot et D. M. Bertrand, « Sur quelques propriétés biochimiques du *Bacillus aminophilus intestinalis* », *C. R. de l'Acad. d. Sciences*, 24 juin 1912, t. CLIV, p. 1826.

2. Albert Berthelot, « Recherches sur la flore intestinale. Isolement des microbes qui attaquent spécialement les produits ultimes de la digestion des protéiques », *C. R. de l'Acad. d. Sciences,* 24 juillet 1911, t. CLIII, p. 306.

3. Albert Berthelot et D. M. Bertrand, « Sur la production possible de ptomaïnes en milieux acides », *C. R. de l'Acad. d. Sciences*, 31 mars 1913, t. CLVI, p. 1027.

solution nutritive renfermant cette fois du glucose et de l'histidine, produire en même temps de l'acide lactique et de l'imidazoléthylamine.

C'est en considérant les propriétés biochimiques du *Proteus* et du *B. aminophilus* que l'idée m'est venue d'étudier leur symbiose. Je me suis tout d'abord demandé si, en ensemençant du lait avec le *Proteus* puis en faisant intervenir le *Bacillus aminophilus* dès le début de la protéolyse, il n'y aurait pas formation de bases toxiques par décarboxylation des acides aminés mis en liberté par l'hydrolyse microbienne de la caséine. Je me rendais bien compte qu'il y avait peu de chances pour qu'il en soit ainsi, étant donné le pouvoir désaminant du premier et l'activité acidogène du second de ces microbes, mais malgré cela j'ai tenté quelques expériences.

J'ai ensemencé deux ballons de lait stérilisé avec un *Proteus* isolé d'une diarrhée infantile, puis après 48 heures de séjour à 37° alors que l'attaque du caseum était à peine commencée, j'ai introduit dans l'un des ballons une forte dose de jeunes corps microbiens de *B. aminophilus*. J'ai replacé les deux ballons à l'étuve et au bout de huit jours j'ai centrifugé les deux cultures, filtré sur bougie Chamberland les parties liquides et comparé leur toxicité pour le cobaye. J'ai constaté que le filtrat obtenu avec la culture de *Proteus* seul était notablement plus toxique que celui préparé avec la culture mixte.

En présence de ce résultat je fis alors l'expérience suivante : j'ensemençai avec du *Proteus*, du *B. aminophilus* ou un mélange des deux microbes, des ballons renfermant les uns une solution de peptone pancréatique de caséine, les autres la même solution additionnée de 1 0/0 de lactose ou de glucose. Cette fois encore les cultures furent filtrées au bout de huit jours et les filtrats éprouvés sur des cobayes. Dans ces conditions j'ai observé que les cultures de *B. aminophilus*, que le milieu soit sucré ou non, ne présentaient qu'une toxicité pratiquement insignifiante ; les cultures de *Proteus* avaient leur toxicité habituelle dans l'eau peptonée simple ou lactosée et une toxicité négligeable avec le milieu glucosé ; enfin les cultures mixtes obtenues avec l'eau peptonée simple présentaient exactement la même toxicité que celles du *Proteus* seul, tandis que les cultures réalisées en présence de lactose ou de glucose étaient pratiquement sans influence nocive sur les cobayes. Enfin, j'ai constaté que sur les milieux solides non sucrés les deux microbes se

développent à côté l'un de l'autre sans qu'il se manifeste une action empêchante ou favorisante quelconque.

Si je m'en étais tenu aux résultats de ces expériences *in vitro* j'aurais dû conclure que dans l'intestin, le *B. aminophilus* toutes les fois qu'il a des sucres à sa disposition, doit se comporter comme un véritable ferment lactique et jouer par conséquent un rôle bienfaisant en gênant les microbes protéolytiques, mais en expérimentant *in vivo*, j'ai pu rapidement me convaincre combien il aurait été imprudent d'adopter de telles conclusions.

En effet, si l'on nourrit de gros rats blancs exclusivement avec du lait stérilisé, partiellement coagulé par la présure, et qu'avec cet unique aliment on administre, chaque jour, à certains d'entre eux, une quantité de *Proteus* ou de *B. aminophilus* correspondant à une demi-culture sur gélose, à d'autres la quantité équivalente d'un mélange à parties égales des deux microbes, on peut faire une série de constatations dont voici les principales (1) :

1° Le *Proteus* seul, même à ces fortes doses, est sans influence apparente sur les rats, ce qui n'est guère étonnant d'ailleurs, puisque ce microbe est l'hôte habituel de leur intestin.

2° La plupart des animaux qui ne reçoivent que du *B. aminophilus* n'en souffrent pas et se maintiennent à peu près à leur poids primitif ; cependant quelques-uns d'entre eux et ce sont toujours les plus jeunes, succombent après un délai de 8 à 10 jours.

3° Tous les rats qui absorbent à la fois les deux microbes présentent au bout de 6 à 8 jours une diarrhée très accentuée ; les matières qu'ils expulsent sont riches en mucus filant et très acides. Ces animaux maigrissent rapidement et presque tous finissent par succomber du dixième au vingtième jour.

4° Si l'on donne à des rats du lait auquel on ajoute une assez forte proportion de caséine sèche ou mieux encore si l'on augmente la dose journalière du mélange de microbes, on observe que les animaux meurent très vite, en 4 à 8 jours ; la phase de diarrhée muqueuse et acide est alors extrêmement réduite et la mort est déterminée par une entérite aiguë à forme hémorragique.

Voici le détail de mes expériences :

1. Albert Berthelot, « Recherches sur la flore intestinale. Sur l'action pathogène d'une association microbienne : *Proteus vulgaris* et *Bacillus aminophilus intestinalis* », *C. R. de l'Acad. des Sciences*, t. CLVI, 19 mai 1913, p. 1567.

I. Trois lots de dix rats blancs, d'un poids variant entre 125 et 180 grammes :

Lot A alimenté avec 500 cc. de lait stérilisé à 120°, partiellement coagulé par addition de quelques gouttes d'une solution de présure filtrée sur bougie et séjour de 18 heures à 37°. A ce lait on mêlait les corps microbiens de *Proteus* recueillis sur cinq tubes de gélose ordinaire (tubes de 170 mm. × 17 mm., cultures de 24 heures à 37°). Le lait ainsi contaminé était administré en deux fois aux rats qui l'absorbaient entièrement dans les 24 heures.

Lot B. — Même quantité de lait, mais au lieu de *Proteus*, même proportion de corps bactériens de *B. aminophilus*.

Lot C. — Même quantité de lait, mais celui-ci était infecté avec le mélange de deux cultures et demi de chacun des deux microbes. Cette expérience a été arrêté le trentième jour.

Résultats. — Lot A. Au bout de huit jours les rats étaient bien portants, mais avaient perdu en moyenne 10 à 25 grammes; au trentième jour tous étaient vivants et en parfait état. Leur amaigrissement individuel avait atteint pour l'un d'eux 45 grammes, mais n'avait pas dépassé en moyenne 30 grammes. Matières fécales constamment normales.

Lot B. — Au bout de huit jours les résultats étaient identiques à ceux du lot A, mais le neuvième jour un rat du poids de 115 grammes avait été trouvé mort (arrière-train souillé par des matières liquides; cerveau, poumons et cœur dévorés par les autres rats). Au trentième jour tous les autres animaux étaient vivants et leurs matières étaient restées constamment normales.

Lot C. — Au cinquième jour les matières de presque tous les rats ont commencé à se ramollir; le septième jour six sur dix expulsaient des matières franchement diarrhéiques constituées par des masses blanchâtres délayées dans un liquide muqueux, filant et très acide au tournesol. Deux jours après tous les rats avaient la diarrhée ; ils étaient très amaigris et leur pelage tout entier était souillé de matières fécales. Au onzième jour, trois d'entre eux sont morts ; d'autres ont succombé les treizième, quatorzième et dix-septième jours, tous ces animaux avaient perdu environ 40 à 55 grammes de leur poids. Au trentième jour un seul rat vivait encore ; son poids avait diminué de 35 grammes, mais il ne présentait plus de diarrhée, ses matières étaient celles d'un animal bien portant.

II. Même expérience que ci-dessus, mais avec trois lots de six rats. Les doses de microbes avaient été réduites en proportion du nombre des animaux. D'autre part, avant de commencer le régime infectant, les rats avaient été nourris pendant dix jours avec du lait stérilisé. Le régime n'avait modifié en rien l'état de leurs matières et n'avait déterminé qu'un léger amaigrissement.

Lots A et B. — Résultats superposables à ceux de l'expérience I, mais

dans le lot B deux rats pesant 105 et 125 grammes étaient morts les huitième et onzième jour, sans avoir eu de diarrhée.

Lot C. — Quatre rats avaient la diarrhée le quatrième jour ; le sixième tous expulsaient des matières fluides, muqueuses et acides. L'un d'eux a succombé le neuvième jour ; au vingt-troisième jour tous étaient morts.

III. Même expérience qu'en I et II ; lots de douze rats. Infection avec six cultures par lot.

Lot A. — Un rat mort le quatorzième jour, cadavre dévoré par les autres. Pas de diarrhée ; matières constamment normales. Onze rats vivants au trentième jour.

Lot B. — Deux rats (115 à 120 grammes) étaient morts l'un le septième jour après avoir eu un jour de diarrhée, l'autre le onzième sans avoir jamais rendu de matières molles. Le cadavre de ce dernier avait été dévoré par les autres rats. Au trentième jour, dix rats vivants.

Lot C. — Cinq rats avaient de la diarrhée dès le cinquième jour ; tous présentaient ce symptôme le huitième jour. Quatre étaient morts le dixième jour ; deux jours après, cinq autres ont succombé. Leur mort est survenue brusquement probablement parce qu'ils avaient dévoré partiellement deux des rats qui étaient morts l'avant-veille. Au trentième jour, trois rats étaient encore vivants ; sur ces trois animaux, deux étaient bien portants et n'avaient plus de diarrhée depuis 10 jours, l'autre était cachectique et a fini par succomber deux semaines après, bien qu'il ait suivi à partir du trentième jour un régime normal.

IV. Un seul lot de dix rats alimentés avec du lait contaminé par la dose habituelle de *Proteus* et de *B. aminophilus*.

La diarrhée caractéristique a commencé chez six rats dès le quatrième jour; tous étaient atteints le septième. Au trentième jour il ne restait plus qu'un rat, qui avait été malade jusqu'au vingt-quatrième jour ; les autres étaient morts entre le sixième et le treizième.

V. Lot de dix rats. Même dose journalière de *Proteus* et de *B. aminophilus*, mais leur alimentation était constituée par le coagulum de 750 cc. de lait présuré, délayé à consistance de bouillie claire avec un peu de lactosérum.

Les animaux ont présenté de la diarrhée dès le cinquième jour. Au trentième jour il en restait deux qui n'avaient plus de diarrhée, mais qui ont malgré tout succombé 5 et 7 jours plus tard ; tous les autres étaient morts du sixième au douzième jour.

VI. Lot de dix rats. Même dose de *Proteus* et de *B. aminophilus*. Alimentation avec le coagulum de 750 cc. de lait, mis en pâte peu épaisse avec 60 grammes de caséine sèche du commerce et un peu de lactosérum. Au quatrième jour trois rats ont succombé sans avoir de diarrhée ; deux jours après deux rats sont morts après avoir expulsé comme les survivants une petite quantité de matières noirâtres et visqueuses. Le lendemain quatre

rats succombaient dans les mêmes conditions et le huitième jour la mort du dernier terminait l'expérience.

VII. Lot de dix rats. Même alimentation riche en caséine, pauvre en lactose, mais dose double de microbes, c'est-à-dire pour chaque animal une culture sur gélose de *Proteus* et une culture de *B. aminophilus*. Dès le troisième jour tous les rats paraissaient malades : les uns rendaient des matières d'apparence normale, les autres expulsaient péniblement une sorte de mucus brunâtre, visqueux, collant leurs poils et adhèrent aux parois du bocal où ils se trouvaient. Tous ont succombé avant le huitième jour ; trois étaient morts le quatrième jour, deux le cinquième, quatre le sixième et un le septième.

VIII. Lot de dix rats. Comme alimentation : coagulum de 750 cc. de lait, délayé dans la moitié du lactosérum séparé. Comme microbes : deux cultures de chacune des deux bactéries par animal. Au huitième jour tous les rats avaient succombé ; cinq étaient morts dès le troisième jour, quatre autres le cinquième, le dernier avait résisté jusqu'au septième jour. Celui-ci avait présenté de la diarrhée à partir du cinquième jour, tandis que la mort des autres était survenue sans signes avant-coureurs bien marqués ; deux d'entre eux seulement avaient rendu des matières enrobées d'un peu de mucus noirâtre et visqueux. Les matières des rats morts le troisième et le quatrième jour étaient très dures, très foncées et alcalines.

IX. Lot de douze rats d'un poids moyen de 150 grammes. Comme unique aliment du lait stérilisé, mais très forte dose de microbes. On leur donnait, en effet, chaque jour les corps bacillaires recueillis sur deux boîtes de Roux de chacune des deux espèces.

Tous les rats de cette expérience ont succombé avant le septième jour : deux dès le troisième, cinq le quatrième, trois le cinquième et les deux derniers le sixième jour. Les animaux morts le troisième et le quatrième jours n'avaient pas présenté de diarrhée ; les autres avaient expulsé pendant les deux derniers jours des matières fluides, assez foncées et contenant une forte proportion de mucosités brunâtres et très visqueuses.

X. Lot de six rats. Même expérience qu'en IX. Mêmes remarques. Deux rats morts le quatrième jour, les quatre autres le lendemain.

Bien entendu, toutes les fois où cela m'a été possible, j'ai fait l'autopsie des animaux morts au cours de ces expériences. Voici ce que j'ai constaté :

1° Rats ayant présenté pendant au moins six jours une diarrhée muqueuse et acide. Foie et reins pâles ; intestin et surrénales congestionnés. L'intestin grêle, souvent distendu par des gaz, contenait des flocons de caséine incomplètement attaquée mêlés à du mucus ; celui-ci, très abondant, était visqueux, filant et acide. Le cœcum était rempli d'une bouillie

grisâtre très acide. En ouvrant l'intestin grêle et le cœcum et en lavant la muqueuse, on voyait de place en place de petites ponctuations hémorragiques. Dans les autopsies faites alors que le cadavre était encore chaud, on ne trouvait le *Proteus*, dans le sang du cœur, que quatre fois sur dix.

2° Rats ayant succombé dès les trois premiers jours de la diarrhée acide. Hyperémie marquée de tous les organes abdominaux. Grosse rate; gros intestin rempli de matières grisâtres riches en mucus, mais beaucoup moins acides que dans le cas des rats malades depuis longtemps ; intestin grêle parfois distendu et très congestionné par places, mais le plus souvent formant une masse dans laquelle il était très difficile d'isoler les anses intestinales agglutinées entre elles et remplies tantôt d'une matière visqueuse et brunâtre, tantôt de caséine incomplètement attaquée mêlée à du mucus. A l'ouverture de l'intestin, dans certaines anses grêles, la muqueuse se détachait en lambeaux grisâtres, dans d'autres on trouvait des placards ecchymotiques; la muqueuse cœcale présentait souvent un piqueté brunâtre qui paraissait être de nature hémorragique. Dans le sang du cœur, présence du *Proteus* sept fois sur dix.

3° Rats ayant succombé très rapidement, parfois après avoir présenté une courte période de diarrhée. Intestin grêle agglutiné en une masse informe, de laquelle il est très difficile d'isoler les anses qui sont remplies d'une matière noirâtre, visqueuse, alcaline, plus ou moins fluide et d'odeur infecte. Cette matière était constituée par un mélange de mucus et de sang altéré ; on la retrouvait dans le cœcum mêlée à de rares masses grisâtres. Les excréments contenus dans le reste du côlon affectaient parfois leur forme ovillée habituelle, mais le plus souvent ils étaient constitués par la même substance alcaline visqueuse et noirâtre qui remplissait l'intestin grêle. Le foie, la rate, les reins et les surrénales étaient en général très congestionnés ; les deux premiers de ces organes étaient même parfois noirâtres. A l'ouverture de l'intestin, mêmes observations que ci-dessus, mais avec phénomènes destructifs et hémorragiques incomparablement plus marqués. Dans le sang du cœur présence du *Proteus* douze fois sur quinze. Je n'ai jamais pu déceler le *B. aminophilus* dans le sang des rats que j'ai autopsiés.

En un mot, il résulte bien de ces expériences que si l'on soumet des rats au régime lacté exclusif et à l'ingestion répétée d'un mélange de *Proteus vulgaris* et de *B. aminophilus intestinalis* on provoque chez eux une entérite qui peut revêtir soit une forme subaiguë caractérisée par une diarrhée muqueuse et acide, soit une forme aiguë hémorragique rapidement mortelle.

Ce point étant bien établi, j'ai cherché s'il était possible d'entraver la marche des phénomènes entéritiques. Pour cela j'ai mis en

expérience 4 lots de 6 rats ; deux de ces lots A et B ont été traités de manière à déterminer la forme aiguë. les deux autres C et D ont été alimentés et infectés de façon à leur donner simplement la diarrhée caractéristique de la forme à évolution lente.

Au troisième jour du régime les animaux des lots A et B étaient déjà manifestement malades, j'ai cessé de donner des microbes au lot B tout en continuant le régime lacté. Malgré cela tous les rats de ce lot sont morts entre le quatrième et le neuvième jour ; ceux du lot A ont tous succombé du quatrième au septième.

Pour les lots C et D j'ai attendu l'apparition de la diarrhée acide et muqueuse ; le lendemain du jour où je l'ai constatée chez tous les rats, c'est-à-dire le neuvième jour, j'ai supprimé les microbes au lot D, tout en continuant l'alimentation lactée. Les rats du lot témoin C ont commencé à succomber le onzième jour, tous étaient morts au vingt-deuxième ; sur les six animaux du lot D je n'ai pu en conserver qu'un seul qui s'est définitivement rétabli, les cinq autres ont succombé du dixième au vingt-septième jour.

J'ai alors répété cette expérience dans des conditions absolument identiques quant aux doses de microbes et au nombre d'animaux formant également quatre lots A′ B′ C′ et D′ ; mais au lieu de supprimer seulement les microbes aux lots B′ et D′ j'ai de plus remplacé le lait par le régime habituel des rats (carottes, pain et blé). Les résultats ont été les suivants :

1° Lots A′ et B′ : douze animaux en expérience sont morts du quatrième au huitième jour ; je n'ai observé aucun retard pour les rats du lot B′.

2° Lots C′ et D′ : Cinq des rats du lots C′ sont morts du douzième au vingtième jour ; le sixième s'est complètement rétabli malgré l'absorption de lait et de microbes jusqu'au trentième jour. Sur les six animaux du lot D′ un seul est mort le douzième jour, tous les autres ont survécu.

En présence de ce fait, j'ai tenu à le vérifier sur un lot de 12 rats. J'ai donné à ces animaux du lait contaminé par les deux microbes de telle manière que la diarrhée a commencé à se manifester le sixième jour ; le lendemain tous rejetaient des mucosités acides. Le huitième jour j'ai supprimé le lait ainsi que le mélange infectant et donné le régime végétarien habituel ; malgré cela deux rats sont morts le dixième jour ; c'étaient d'ailleurs les deux plus petits du lot et ils ne pesaient que 135 grammes. Tous les autres ont survécu ; quatre jours après la suppression du régime

nocif la diarrhée avait disparu et les matières présentaient leur aspect normal.

Par un régime convenable, et en cessant de leur donner des microbes, on peut donc guérir les animaux présentant depuis un ou deux jours une diarrhée légère, mais on ne peut empêcher la mort des rats présentant les symptômes de début de la forme aiguë.

D'autre part j'ai constaté que la guérison des animaux légèrement malades peut être obtenue, sans qu'il soit nécessaire de cesser le régime infectant, à l'aide d'un vaccin préparé avec un mélange des deux microbes tués par l'éther.

Dans une première expérience portant sur un lot de dix gros rats présentant tous un début de diarrhée après cinq jours de régime, j'ai pratiqué trois injections sous-cutanées d'une émulsion microbienne traitée par l'éther, à la manière de Vincent, et correspondant à la dilution de deux cultures de *Proteus* et de deux cultures de *B. aminophilus* dans 80 cc. d'eau physiologique. Ayant préalablement déterminé sur des rats de même poids la dose de vaccin qu'ils pourraient supporter, j'ai fait à chaque animal le lendemain du début de la diarrhée une première injection de 3 cc. Bien que j'aie continué à leur donner lait et microbes, dès le lendemain ils rendaient des matières moulées, mais un jour après la diarrhée reprenait peu intense quoique persistante. Au onzième jour de l'expérience j'ai fait une seconde injection de 4 cc. ; vingt-quatre heures après la diarrhée s'atténuait ; le lendemain ils expulsaient des matières encore molles, mais quatre jours après l'injection celles-ci avaient repris leur apparence normale. Craignant une rechute, le dix-septième jour j'ai encore injecté à 4 cc. de vaccin sans observer aucune modification dans l'état des animaux qui n'a plus cessé d'être excellent. A la fin du deuxième mois tous étaient encore vivants bien qu'ils n'aient plus cessé d'absorber tous les jours leur dose habituelle de lait et de microbes, tandis que les dix rats d'un lot témoin étaient tous morts avant le vingtième jour.

J'ai répété cette expérience dans des conditions identiques ; les résultats ont été aussi bons, car il me semble ne pas avoir à tenir compte de la mort d'un des rats vaccinés survenue au trente-sixième jour, cet animal étant comme tous les autres guéri depuis longtemps de sa diarrhée. Son cadavre ayant été presque complètement dévoré je n'ai pu établir les causes de sa mort.

Lorsqu'on intervient tout à fait au début de la forme subaiguë

de l'entérite expérimentale, c'est-à-dire lorsque les animaux ont la diarrhée depuis seulement 1 ou 2 jours, le vaccin mixte possède donc une action curative incontestable ; mais celle-ci ne se manifeste pas dans la forme aiguë ou lorsqu'on intervient trop tard dans la forme simplement diarrhéique. Toutefois dans ce dernier cas un certain nombre des rats traités succombent 15 à 25 jours plus tard que les témoins.

Dans la forme aiguë hémorragique la vaccination précipite même la marche des accidents, absolument comme le font d'ailleurs de trop fortes doses de vaccin (6 cc.) injectées au début de la diarrhée. Plusieurs expériences m'ont montré que dans l'infection intense la mort survient dans les 24 heures qui suivent l'injection vaccinante ; les doses trop fortes dans la forme légère font mourir les animaux trois ou quatre jours avant les témoins. Si les conditions dans lesquelles le vaccin est utilisable comme moyen de traitement sont assez étroites, son action préventive se manifeste avec beaucoup plus de netteté. En effet, j'ai traité douze rats, d'un poids moyen de 170 grammes, par trois injections de 4, 5 et 6 cc. d'émulsion microbienne ; les injections étant faites de 8 jours en 8 jours, j'ai pu, quatre jours après la dernière, soumettre impunément les animaux ainsi traités au régime qui donne à coup sûr l'entérite muqueuse. J'ai prolongé pendant deux mois l'influence du lait et des microbes ; pendant tout ce temps l'état général des rats vaccinés m'a toujours paru excellent et leurs matières n'ont pas cessé de présenter leur aspect normal, tandis que tous les animaux d'un lot témoin avaient succombé entre le dixième et le vingtième jour, après avoir présenté la diarrhée muqueuse et acide caractéristique.

Bien entendu, au cours de toutes ces expériences sur les rats, j'ai examiné les matières fécales au point de vue bactériologique ; toutefois j'ai négligé celles qui provenaient d'animaux succombant rapidement à la forme aiguë hémorragique et j'ai porté toute mon attention sur celles des animaux présentant la forme diarrhéique à évolution plus lente.

J'ai remarqué qu'au début de la diarrhée, les déjections blanc-jaunâtre étaient peu acides ; quelquefois même les animaux avaient quelques selles neutres après en avoir eu de nettement acides. A partir du deuxième jour l'acidité allait sans cesse en augmentant pour atteindre en général son maximum vers le cinquième, en même temps que s'accroissait la teneur en mucus et

que les selles devenaient plus fluides. A ce moment elles présentaient une odeur fade, extrêmement désagréable ; elles conservaient ce caractère, ainsi que leur grande acidité et leur aspect glaireux jusqu'à la mort de l'animal.

Parallèlement à ces modifications, j'ai observé dans les matières la prédominance croissante du *Proteus* et du *B. aminophilus*, puis la multiplication de deux bacilles prenant le Gram dont l'un ne tardait pas à devenir prépondérant. J'ai isolé ces deux microbes ; le moins abondant était le *B. perfringens*, il n'était d'ailleurs pas absolument constant dans les selles très acides. L'autre qui se développait admirablement dans le bouillon lactique, coagulait le lait sans modifier le caillot, acidifiait les milieux contenant du lactose, du saccharose, du galactose ou du glucose et ne donnait pas d'indol, était très vraisemblablement identique au *B. acidophilus* de Moro, car il en présentait également tous les caractères morphologiques et biologiques.

Au moment où les selles diarrhéiques étaient à leur maximum d'acidité et jusqu'à la mort ou à la guérison des animaux, la flore était presque uniquement constituée par le *Proteus*, le *B. aminophilus* et le *B. acidophilus* (1), ce dernier en très grande abondance.

Quant aux matières des rats normaux, ainsi que je l'ai déjà dit, j'y ai presque toujours trouvé le *Proteus vulgaris*, mais je n'y ai jamais rencontré le *B. aminophilus*. Les *Proteus* isolés chez des rats bien portants ne différaient en aucune façon du *Proteus* de diarrhée infantile que j'ai employé pour mes expériences. J'ai fait notamment une expérience sur un lot de dix rats que j'alimentais avec du lait infecté avec du *B. aminophilus* et un *Proteus* isolé par M. Metchnikoff dans les déjections de tout jeunes rats ; les résultats que j'ai obtenus (diarrhée muqueuse et acide, mort en 8 à 13 jours) ont été ceux que m'auraient donné mon *Proteus* d'origine infantile.

Enfin j'ai complété mes expériences en recherchant si les matières contenues dans l'intestin des rats malades contenaient une quantité appréciable de substances toxiques. Pour cela j'épui-

1. Dans les derniers jours de la maladie le Bacille acidophile joue peut-être un rôle important qu'il sera nécessaire de préciser. Ce microbe a d'ailleurs été signalé, par Finkelstein, Escherich et Salge, comme très abondant dans les matières des nourrissons atteints de certaines gastro-entérites aiguës.

sais la masse recueillie dans l'intestin par l'alcool à 96° additionné de 1 cc. pour 100 d'acide chlorhydrique concentré ; j'évaporais à sec, au bain-marie, la liqueur alcoolique obtenue claire par centrifugation. Je reprenais par l'eau le résidu de cette évaporation, je faisais bouillir cette solution quelques instants avec du noir animal, je la filtrais et je la concentrais au bain-marie. Quand il ne restait plus que 2 ou 3 centimètres cubes de liquide légèrement acide, je neutralisais exactement avec quelques gouttes d'une solution de carbonate de sodium à 5 pour 100 et je complétais à 10 cc. avec de l'eau physiologique à 7,5 0/00. Comme j'opérais toujours sur le contenu intestinal de deux rats, je savais à quoi correspondait ce volume de liquide, que j'éprouvais en l'injectant dans la jugulaire de gros cobayes de 600 à 650 grammes.

Dans ces conditions, avec 5 cc. de liqueur, j'ai constaté que l'extrait du contenu intestinal d'un rat bien portant alimenté avec du lait sans microbes était sans action nocive pour le cobaye ; lorsque l'extrait provenait d'un animal venant de succomber à la forme diarrhéique subaiguë les cobayes étaient malades, mais se rétablissaient vite et ne présentaient plus aucun signe d'intoxication une heure après l'injection. Avec la solution obtenue en traitant le contenu intestinal d'un rat venant de mourir après quatre jours du régime hyperazoté et très riche en microbes, j'ai noté, au contraire, une toxicité élevée. En effet, cinq centimètres cubes d'extrait tuaient l'animal sur l'appareil à contention et trois centimètres cubes déterminaient sa mort en quatre ou cinq minutes avec dyspnée violente, contraction très forte du diaphragme, péristaltisme exagéré, distension extrême des poumons et persistance des battements cardiaques quelques instants encore après la cessation des mouvements respiratoires.

Ces symptômes rappelant singulièrement ceux que l'on observe chez les cobayes succombant à l'injection intraveineuse d'un demi milligramme d'imidazoléthylamine, il est bien possible que la toxicité du contenu intestinal des rats profondément infectés et intoxiqués soit due à cette même base. Celle-ci proviendrait tout naturellement de l'action du *B. aminophilus* sur l'histidine libérée par l'hydrolyse diastasique de la caséine alimentaire et de l'hémoglobine du sang des hémorragies intestinales.

En même temps que je faisais avec des rats blancs toutes les expériences que je viens de rapporter, j'ai fait quelques essais sur

d'autres animaux. Avec les souris blanches il m'a été facile de reproduire les recherches que j'avais faites avec les rats, car elles toléraient bien le régime lacté et l'infection massive par le *B. aminophilus* ou le *Proteus* ; avec le mélange des deux microbes elles avaient, comme les rats, une diarrhée acide et muqueuse, mais celle-ci était de peu de durée, car la mort survenait toujours avant le onzième jour ; certaines souris succombaient même entre le cinquième et le septième jour après vingt-quatre heures de diarrhée.

A deux lapins alimentés avec du son et des carottes, j'ai essayé de faire absorber les deux microbes et de la caséine. Pour cela je mêlais cette substance au son et j'arrosais le tout avec du lait dans lequel je délayais une forte proportion de corps microbiens de *Proteus* et de *B. aminophilus*. Les animaux prenaient très peu de ce mélange ; après cinq jours de régime ils eurent une abondante diarrhée acide, mais non muqueuse, puis leurs matières reprirent leur consistance normale. Au vingt-deuxième jour du régime l'un d'eux eut brusquement une violente crise diarrhéique à laquelle il succomba en 36 heures ; je ne pus malheureusement l'autopsier que plus de vingt-quatre heures après sa mort, mais il me fut cependant possible de constater l'existence de vastes ulcérations de la muqueuse de l'appendice et du cœcum avec une congestion violente de tout l'intestin.

Le second lapin fut sacrifié au 35e jour du régime ; ses matières étaient normales et à l'autopsie je ne trouvai autre chose qu'un abondant piqueté hémorragique sur la muqueuse appendiculaire.

J'ai également soumis au régime infectant un petit macaque de 950 grammes ; je lui donnais autant de lait qu'il voulait en boire et je lui faisais absorber chaque jour cinq cultures sur gélose de chaque microbe. Après 6 jours de régime, il fit une crise de diarrhée acide et muqueuse qui dura 48 heures, puis il se rétablit parfaitement. Il mourut au 45e jour de l'expérience, sans que j'aie pu établir les causes de la mort ; toutefois en l'autopsiant il me fut possible de constater l'existence de nombreuses adhérences entre le cœcum, le côlon ascendant et la masse des anses grêles, l'estomac et le côlon transverse. Au niveau de ces adhérences la muqueuse du côlon présentait des taches foncées d'aspect ecchymotique.

Enfin, j'ai tenté une expérience avec deux chimpanzés. Ces deux animaux avaient du *Proteus* dans les fèces ; l'un expulsait des matières alcalines très molles qui contenaient, en abondance, un

microbe acidaminolytique se développant bien sur l'histidine, mais sans donner de ptomaïne ; l'autre rendait des matières acides et dures.

J'ai essayé en vain de les habituer au régime lacté ; voyant cela, je pris le parti de leur donner chaque matin, à jeun, les *Proteus* recueillis sur trois boîtes de Roux de gélose ordinaire et la même dose de *B. aminophilus*, le tout mêlé au coagulum de deux litres de lait additionné d'une assez forte proportion de sucre. En opérant de cette manière, ils absorbaient à peu près tout le mélange et il me suffisait de compléter leur alimentation en leur donnant le soir quelques bananes et du lait à discrétion.

Après quinze jours de ce régime ils eurent une petite poussée de diarrhée, avec matières acides mais non muqueuses ; mais en trois jours ils se rétablirent parfaitement et ne cessèrent d'être en bonne santé jusqu'à la fin de l'expérience que j'interrompis vers la cinquième semaine.

En résumé, parmi les animaux avec lesquels j'ai expérimenté, il n'y a que les rats et les souris qui m'aient constamment donné des résultats permettant d'affirmer la nocivité de l'association du *Proteus vulgaris* et du *B. aminophilus* pour les sujets soumis au régime lacté exclusif.

Depuis que M. Metchnikoff, dans ses recherches sur le choléra (1), a montré l'importance du rôle des associations microbiennes en pathologie, bien des auteurs ont fait dans le même ordre d'idées des constatations très intéressantes ; il y a quelques années M. H. Vincent a montré notamment que le *Proteus* donne avec le bacille d'Eberth une symbiose particulièrement nocive (2). Malgré tous ces travaux, certains bactériologistes s'obstinent à considérer individuellement les nombreuses espèces de la flore intestinale et ne semblent pas avoir saisi l'intérêt qu'il y a d'étudier également l'action pathogène des cultures symbiotiques des microbes intestinaux, ainsi que les phénomènes morbides que l'on peut provoquer chez les animaux en réalisant, dans leur tube digestif, la prépondérance de ces mêmes symbioses. Les faits que

1. Metchnikoff, « Recherches sur le choléra et les vibrions. 4e mémoire. Sur l'immunité et la réceptivité vis-à-vis du choléra intestinal », *Ann. de l'Institut Pasteur*, t. VIII, 1894, p. 529.

2. Vincent, « Rôle pathogène du *Proteus* dans les infections alimentaires. Association microbienne protéo-typhique », *Bull. Acad. de Médecine*, t. LXII, 3e série 1909, p. 338.

je viens de rapporter contribueront peut-être à les convaincre. Pour ma part, je compte poursuivre mes recherches sur le rôle des associations microbiennes en utilisant beaucoup d'autres microbes, pris, aussi bien dans la flore intestinale de l'homme que dans celle des jeunes animaux domestiques.

Ce n'est d'ailleurs pas seulement en précisant l'action pathogène des associations de deux ou plusieurs espèces, préalablement étudiées une à une, que l'on étendra nos connaissances sur le rôle de la flore intestinale, mais aussi en examinant avec soin leur action biochimique, ainsi que je l'ai déjà recommandé lors de mes premières recherches sur les microbes acidaminolytiques. Dans le cas particulier de la symbiose du *Proteus* avec le *B. aminophilus* il est même indispensable que j'entreprenne cette étude pour essayer d'expliquer le mécanisme des phénomènes pathologiques que j'ai observés, mécanisme à l'égard duquel je suis, pour le moment, réduit aux hypothèses.

En dehors des idées qu'elles suggèrent sur l'utilité de l'étude des associations bactériennes, les constatations que j'ai eu l'occasion de faire au cours de mes expériences se prêtent encore à des considérations intéressantes à divers autres points de vue.

Tout d'abord il me semble bon de rappeler le rôle très important que paraît jouer le *Proteus vulgaris* dans l'étiologie de certaines gastro-entérites des nourrissons, rôle entrevu par Booker (1), mais nettement établi par les recherches de M. Metchnikoff (2). Or dans ces entérites, la flore intestinale renferme très fréquemment à côté du *Proteus*, une forte proportion de microbes voisins du *B. aminophilus* et appartenant comme lui au groupe du *B. lactis aerogenes*. On sait d'autre part, que dans ces affections, qui présentent des formes aiguës et subaiguës, les matières sont souvent riches en mucus et très acides ; parfois aussi, dans ces mêmes diarrhées le lait est mal toléré, tandis qu'on retire grand avantage de la suppression de cet aliment.

Comme on le voit, *certaines* gastro-entérites des nourrissons présentent de nombreux points communs avec l'affection intesti-

1. Booker, *Trans. of the Ninth Internat. Congr. 1887*, t. III, « A study of some bacteria in the faeces of infants affected with summer diarrhœa » *Trans. of the Amerc. Pediat. Soc.* 1889 ; même sujet : *John Hopkins Hosp. Rep.*, t. IV, 1896-97, p. 159.

2. Metchnikoff, « Recherches sur les diarrhées des nourrissons », *Bull. de l'Acad. de Médecine*, t. LXII, 29 nov. 1909, p. 326.

nale que détermine, chez le rat, le régime lacté exclusif et l'infection mixte du tube digestif par le *Proteus* et le *B. aminophilus intestinalis*. Je ne voudrais pas que l'on me fît dire que toutes les diarrhées muqueuses et acides des jeunes enfants sont dues à l'association du *Proteus* avec un microbe du genre *Lactis aerogenes*, car je n'ai jamais eu cette pensée. J'ai simplement voulu attirer l'attention sur la ressemblance évidente des formes d'entérite expérimentale que j'ai réalisées et *certaines* gastro-entérites infantiles, ressemblance qui me conduit à rechercher notamment si les unes et les autres ne sont pas déterminées par une même cause : l'association du *Proteus* avec le *B. aminophilus ou une espèce voisine*.

A ce propos il me paraît intéressant de signaler que j'ai justement utilisé pour toutes mes expériences un *Proteus* isolé par M. Metchnikoff des matières fécales d'un nourrisson mortellement atteint d'une gastro-entérite ; ces matières étaient acides et avaient donné sur milieu de Drigalsky-Conradi de nombreuses colonies semblables à celles de *B. lactis aerogenes*.

Pour moi, dans les cas de diarrhée infantile *où il intervient*, le *Proteus* ne manifeste son action que grâce à la présence d'un ou de plusieurs microbes favorisants. Celui-ci ou ceux-ci doivent-ils nécessairement appartenir au groupe acidogène du Pneumobacille et du *Lactis aerogenes* ? Je ne le pense pas, je suis persuadé, au contraire, qu'un grand nombre d'espèces microbiennes peuvent jouer ce rôle, particulièrement dans la catégorie des acidaminolytiques. Si je crois à l'importance de ces dernières, c'est parce que ce sont elles qui produisent dans notre intestin, les poisons chimiques, les plus actifs ; les unes, qui sont en même temps saccharolytiques, déterminent vraisemblablement les diarrhées fortement acides et muqueuses, tandis que les autres n'attaquant pas les sucres, conditionnent probablement les diarrhées alcalines (1).

Je ne m'arrêterai pas davantage aux nombreuses hypothèses que l'on pourrait faire dans cet ordre d'idées ; il y a souvent bien loin de ce que nous observons *in vitro* à ce qui se passe dans l'intestin et, dans l'interprétation des faits qui m'occupent, il serait singulièrement imprudent d'oublier la part prépondérante qui doit

1. Il ne faut pas oublier cependant, que la désamination microbienne des molécules aminoïques fournit des acides, qui interviennent peut-être pour une part notable dans la genèse des phénomènes pathogènes attribués aux acides provenant de l'attaque des hydrates de carbone.

revenir aux phénomènes digestifs et aux défenses de l'organisme.

Quels que soient la nature et le mode d'action des microbes dont l'on établira les propriétés favorisantes, on peut déjà, dans ce que j'ai observé, trouver quelques indications sur la pathogénie probable des gastro-entérites à *Proteus*. Il doit y avoir, en effet, des nourrissons porteurs de ce microbe, qui restent bien portants jusqu'au moment où ils sont infectés par une espèce favorisante ; il doit y avoir, également, des enfants dont la flore comporte les éléments d'une association pathogène et qui ne présentent des symptômes entéritiques que le jour où la composition chimique de leur milieu intestinal se trouve profondément modifiée, soit par des troubles fonctionnels des glandes digestives, soit par un changement de régime (par exemple : remplacement du lait maternel par le lait de vache). Enfin, quand on se souvient de l'influence que possèdent sur l'évolution de l'entérite expérimentale, les variations de la dose de bactéries infectantes, l'on ne peut s'étonner de voir les nourrissons contracter les formes graves de gastro-entérite pendant la saison chaude, c'est-à-dire lorsque le lait contient la plus forte proportion de microbes.

Si artificielles que soient les conditions dans lesquelles je l'ai réalisée, l'entérite expérimentale du rat n'est pas seulement intéressante à cause de sa ressemblance avec *certaines* entérites des nourrissons ; elle l'est aussi, à un point de vue plus général, par les idées qu'elle suggère sur l'étiologie et la pathogénie de certaines affections de l'intestin. Elle montre, en effet, combien il importe, dans certains cas, de ne pas attribuer un état pathologique donné à un seul microbe, mais plutôt à l'action combinée d'une association microbienne et d'une alimentation défectueuse ; elle attire l'attention sur le rôle que doivent avoir les espèces acid-aminolytiques dans la genèse de certaines infections du tube digestif. Au début de mes recherches sur les microbes de ce groupe, je ne voyais en eux que des facteurs importants d'auto-intoxication, mais depuis mes expériences avec le *B. aminophilus* et le *Proteus*, je suis persuadé que parfois ils sont aussi des facteurs directs ou indirects d'infection locale (1).

Enfin, l'entérite du rat, avec sa forme subaiguë à diarrhée muqueuse et acide, fait voir également l'intérêt qu'il y a d'étudier

1. Sans oublier bien entendu qu'ils peuvent être parfois des facteurs d'infection générale, comme un grand nombre d'autres microbes de l'intestin.

à part, les entérites au cours desquelles les matières sont constamment acides ; elles nous confirment, M. D. M. Bertrand et moi, dans les idées que nous ont données, sur l'étiologie de certaines colites muqueuses persistantes, les recherches que nous poursuivons depuis plus de deux ans et qui nous ont déjà conduit à établir que la production de ptomaïnes par certains acidaminolytiques peut s'effectuer en milieu nettement acide.

Dans un autre ordre d'idées, les résultats que j'ai obtenus avec un vaccin mixte me semblent aussi présenter quelque intérêt. Si sommaires qu'aient été mes expériences, il est incontestable, qu'au point de vue préventif, elles donnent le droit de se demander s'il ne sera pas possible de vacciner les nourrissons contre *certaines* gastro-entérites, dès que nos connaissances étiologiques seront un peu plus complètes. On aura même d'autant plus de chances de succès que l'on pourra utiliser des méthodes d'immunisation plus actives, comme celles de M. Ch. Nicolle ou de M. Besredka.

Pour essayer de réaliser une telle vaccination, il est tout indiqué de faire d'abord, ainsi que je me le propose, de nombreux essais sur de très jeunes animaux domestiques, si sensibles, eux aussi, aux infections gastro-intestinales ; mais auparavant il faudra préciser s'il est nécessaire que les vaccins soient mixtes ou s'il suffit, au contraire, d'utiliser un seul microbe, celui qui constitue l'élément virulent de l'association bactérienne dont on a établi le rôle pathogène.

Les faits que j'ai observés relativement à l'action curative des injections vaccinantes sont moins nets que les précédents ; ils donnent néanmoins une nouvelle base expérimentale à la vaccinothérapie des affections inflammatoires de l'intestin. Il y a un certain temps déjà que les médecins anglais, à la suite des travaux de Wright, traitent par des auto-vaccins certaines infections chroniques de l'intestin (1), mais chez nous on a généralement mis en doute les résultats qu'ils ont obtenus.

Mes expériences, en éliminant le facteur psychique auquel on attribue souvent les succès de la vaccinothérapie, restreindront, peut-être, le nombre des sceptiques, déjà diminué par les constatations faites récemment sur l'effet favorable des vaccins de Chan-

1. R. W. Allen, *Vaccine therapy its theory and practice* ; 4e édit. 1912, H. K. Lewis, Londres, p. 226.

temesse, de Vincent ou de Besredka dans le traitement de la fièvre typhoïde. Elles montrent nettement en tout cas, qu'avec des vaccins appropriés, l'on peut essayer, si paradoxal que cela paraisse, de traiter avec quelques chances de succès *certaines* entérites ; elles font même voir *combien il faut être prudent* dans les essais de ce genre, aussi bien au point de vue de l'opportunité même de la vaccination, qu'au sujet de la composition des vaccins et du choix de la dose à injecter.

30 juin 1913.

CONCLUSIONS

I. J'ai examiné soixante-et-une races de *Proteus* d'origines diverses qui toutes présentaient à un degré variable les caractères incontestés du *Proteus vulgaris* : mobilité, liquéfaction de la gélatine et coagulation du lait suivie de la digestion du coagulum, production d'ammoniaque et d'hydrogène sulfuré.

Au point de vue des caractères discutés j'ai constaté qu'aucun de ces *Proteus*, ne prenait le Gram (Méthode de M. Nicolle), ne produisait de phénol et n'acidifiait les milieux lactosés ou mannités. Tous, au contraire, acidifiaient plus ou moins rapidement et fortement les milieux contenant du glucose, du saccharose ou du galactose ; tous également donnaient de l'acide indolacétique.

II. Au sujet de la production d'indol j'ai observé que tous les *Proteus vulgaris* sont capables d'attaquer le tryptophane et de produire aux dépens de cet acide aminé au moins de l'acide indol-3-acétique. L'espèce *Bacillus proteus anindologenes* n'a aucune raison d'être et l'on doit considérer comme *Proteus vulgaris* Hauser tout microbe possédant, avec les autres caractères de cette espèce, la propriété de produire, dans un milieu convenablement choisi, soit de l'indol, soit de l'acide indol-acétique, ou bien un mélange de ces deux corps.

III. J'ai étudié le pouvoir pathogène d'une race de *Proteus* isolée des matières d'un enfant atteint de gastro-entérite aiguë. J'ai constaté que son action sur les animaux ne différait pas de celle des *Proteus* d'autres origines.

Avec la même race de *Proteus*, j'ai observé également que, dans la toxicité des cultures totales en milieux liquides, la part qui revient aux substances de nature alcaloïdique est faible. Enfin, j'ai constaté que les corps microbiens possédaient une toxicité propre assez élevée due à divers facteurs parmi lesquels se trouve une

« endotoxine », que j'ai réussi à obtenir en solution, dans l'eau dite « physiologique » à 7,5 de NaCl pour 1.000.

IV. J'ai pu facilement immuniser des lapins, contre un *Proteus* de diarrhée infantile, en leur injectant dans les veines des microbes vivants très dilués suivant la technique préconisée par Ch. Nicolle. J'ai également immunisé des cobayes par des injections sous-cutanées de vaccins préparés de diverses manières (bacilles sensibilisés, bacilles tués par l'éther ou le chlorure d'éthyle etc.).

V. J'ai vérifié que la choline possède une action anti-infectieuse incontestable à l'égard du *Proteus*, ainsi que l'avait établi Tito Carbone.

A ce propos j'ai constaté que cette action n'est pas limitée à un seul microbe et que la choline et la neurine semblent susceptibles d'augmenter considérablement la résistance de l'organisme à divers virus.

VI. D'autre part, j'ai observé que si l'on soumet des rats blancs au régime lacté exclusif et à l'ingestion répétée d'un mélange de *Proteus vulgaris* et de *Bacillus aminophilus intestinalis*, microbe voisin du *B. lactis aerogenes*, on provoque chez ces animaux, une entérite qui peut revêtir soit une forme subaiguë caractérisée par une diarrhée muqueuse et acide, soit une forme hémorragique rapidement mortelle.

Tout à fait au début de la forme subaiguë les accidents peuvent être arrêtés en substituant l'alimentation habituelle au régime infectant, mais le même résultat peut être obtenu, sans cesser d'administrer le lait et les microbes, en injectant sous la peau des animaux des doses croissantes et convenablement choisies d'un vaccin préparé avec un mélange des deux bacilles tués par l'éther. L'effet curatif du vaccin ne se manifeste pas dans la forme aiguë ou lorsqu'on intervient trop tard dans la forme simplement diarrhéique.

Enfin, si l'on traite préventivement des rats par trois injections de ce même vaccin mixte, on peut, quatre jours après la dernière injection, les soumettre impunément au régime qui donne à coup sûr l'entérite muqueuse, et qui fait mourir les animaux témoins dans un délai variant entre dix et vingt jours.

Ces faits m'ont permis d'insister sur le rôle des associations microbiennes en pathologie intestinale ; ils m'ont aussi donné l'indication de recherches à entreprendre, dans le même ordre d'idées,

sur l'étiologie de diverses catégories d'entérites et sur l'application des vaccins au traitement et à la prophylaxie de celles-ci. Ils m'ont également fourni une nouvelle occasion de mettre en relief l'importance des microbes acidaminolytiques de la flore intestinale, comme facteurs d'infection et surtout d'auto-intoxication.

VU :
Le Président de la thèse,
LANDOUZY.

VU :
Le Doyen,
LANDOUZY.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :
Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,
L. LIARD.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 1

PREMIÈRE PARTIE

Etude critique de quelques caractères différentiels du « Proteus vulgaris » Hauser

CHAPITRE PREMIER. — Le *Proteus* et la méthode de Gram . . . 5

Conclusions 9

CHAPITRE II. — Action du *Proteus* sur les hydrates de carbone . . 10

Conclusions 13

CHAPITRE III. — Le *Proteus* considéré comme producteur de phénol et d'indol 15

A. - *Recherche du phénol et du p. crésol.* 15

Conclusions. 17

B. — *Etude de la fonction indologène* 17

Historique 18

Etude critique de la technique employée par certains auteurs pour rechercher l'indol dans les cultures microbiennes 19

Origine de l'indol. — Le tryptophane et ses dérivés . . 22

Procédé de recherche de l'indol mettant à l'abri des plus importantes causes d'erreur 24

Recherche de l'acide indol-3-acétique 26

Pages

Milieux chimiquement définis à base de tryptophane . . 28
Variabilité du pouvoir indologène 30
Conclusions 34

DEUXIÈME PARTIE

Recherches sur l'action pathogène d'un « Proteus vulgaris »

Chapitre premier. — Virulence. — Toxicité des cultures totales stérilisées et des filtrats 35

A. — *Virulence du « Proteus Tx »*. 36
B. — *Toxicité des cultures totales du « Proteus Tx » en divers milieux*. 38
Emploi des milieux à base d'acides aminés 39
C. — *Toxicité des filtrats* 41

Chapitre II. — Toxicité des corps microbiens 44

Corps microbiens desséchés à 37°. 46
Corps microbiens légèrement autolysés, desséchés dans le vide 46
Corps microbiens plasmolysés par le chlorure de calcium. . 47
Corps microbiens tués par l'acétone 47
Corps microbiens tués par l'alcool. 48
Corps microbiens épuisés par une solution faible de carbonate de sodium 48
Corps microbiens épuisés par l'alcool, l'acétone, l'éther et le chloroforme 49

Chapitre III. — Autolysats et endotoxine. Lésions produites par les poisons du *Proteus* 51

A. — *Toxicité des autolysats* 51
B. — *Endotoxine* 52
C. — *Poison de Vaughan* 54
D. — *Lésions produites par les diverses solutions et émulsions toxiques étudiées* 56

Chapitre IV. — Essais d'immunisation contre un *Proteus* provenant d'un cas de diarrhée infantile 59

Vaccination des lapins par voie intra-veineuse 60
Vaccination des cobayes par voie sous-cutanée. 61
Emploi du chlorure d'éthyle dans la préparation des vaccins . 61

Chapitre V. — Action anti-infectieuse de la choline et de la neurine. 64

TROISIÈME PARTIE

Recherches sur l'action pathogène d'une association microbienne « Proteus vulgaris » et « Bacillus aminophilus intestinalis ».

Pages

Importance de l'étude des symbioses dans les recherches sur la flore intestinale 69
Le *Bacillus aminophilus intestinalis* 70
Action pathogène et toxicité des cultures simples ou mixtes de *Proteus* et de *B. aminophilus* 71
Effets de l'ensemencement massif du tube digestif des animaux par l'association du *Proteus* et du *Bacillus aminophilus*. — L'entérite expérimentale du rat au régime lacté ; ses différentes formes . 72
Exposé détaillé des expériences sur le rat. 73
Traitement diététique de l'entérite expérimentale. 76
Vaccinothérapie 78
Vaccination préventive 79
Examen bactériologique des matières fécales des rats malades . . 79
Toxicité du contenu intestinal des animaux venant de succomber à l'entérite expérimentale 80
Expériences avec la souris, le lapin et le singe 81
Considérations sur l'étiologie, la pathogénie, le traitement et la prophylaxie de diverses catégories d'entérites humaines et animales. 83

CONCLUSIONS GÉNÉRALES. 89

LAVAL. — IMPRIMERIE L. BARNÉOUD ET Cie.